

HARALABOS ZORBAS

**ISOLIERUNG EINES GEWEBESPEZIFISCH
REGULIERTEN HUH-N-GENS
UND CHARAKTERISIERUNG SEINER EXPRESSION**

MÜNCHEN

1986

07



ISOLIERUNG EINES GEWEBESPEZIFISCH
REGULIERTEN HUHN-GENS
UND CHARAKTERISIERUNG SEINER EXPRESSION

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Haralabos Zorbas

aus Thessaloniki/Griechenland

München 1986

1. Berichterstatter: Prof.Dr. K.Wolf

2. Berichterstatter: Prof.Dr. C.David

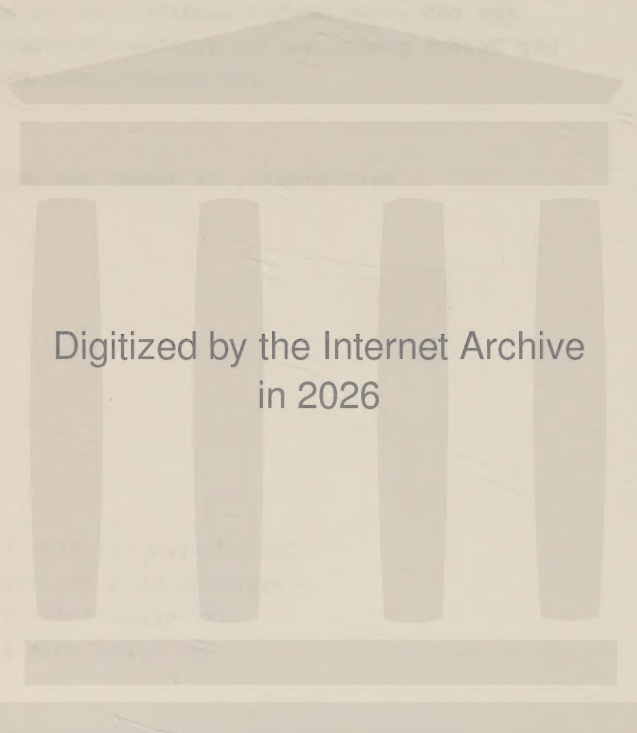
Sondervotum: Prof.Dr. K.Kühn

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1987

Ich glaube an die sanfte Gewalt der Vernunft
über die Menschen. Die Verführung,
die von einem Beweis ausgeht, ist zu groß.
Das Denken gehört zu den größten Vergnügungen
der menschlichen Rasse.

Bert Brecht, *in Leben des Galilei*

Στόν Γιώργο και στην Ελένη
αφιερώνω αυτή την εργασία
σαν σύμβολο εκτίμησης
του δικού τους έργου



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof.Dr. K.Wolf (Institut für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität in München) im Laboratorium von Dr.habil. P.K.Müller, Abteilung für Bindegewebforschung im Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried bei München), angefertigt.

Herrn Prof.Dr. K.Kühn, Direktor der Abteilung für Bindegewebforschung, möchte ich für die Möglichkeit der Anfertigung der Arbeit, für sein Interesse und konstruktive Kritik, sowie für seine großzügige Unterstützung bei Fortbildungsveranstaltungen, die ich besucht habe, herzlich danken.

Für die langjährige Betreuung und die Weitsicht, angewandte Toleranz und praktische Hilfe und nicht zuletzt für die sorgenvolle Durchsicht des Manuskripts bin ich Herrn Dr.habil. P.K.Müller zu tiefem Dank verpflichtet.

Meinem Arbeitskollegen, Dr. E.Pöschl, spreche ich meinen besonderen Dank für seine freundliche Anleitung bei vielen Methoden, die Überlassung von Daten und für fruchtbare Diskussionen aus.

Ich möchte die Kooperation der Tübinger Studenten C.Steiner und E.Ferrando, sowie die Hilfe von Frau Dr.med. I.Michel, dankend erwähnen. Andere Mitarbeiter der Abteilung, insbesondere Dr. M.Paulsson, D.Brazel, Frau Dr. I.Oberbäumler, Frau H.Kadner, Dr.habil. K.von der Mark und Dr. T.Voss, standen mir auch oft mit Rat und Tat zur Seite. Diesen allen danke ich.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof.Dr. K.Wolf, Herrn Prof.Dr. R.Schweyen und Frau Prof.Dr. I.Grummt, die mir in entscheidenden Momenten Mut zugesprochen haben.

Für das besondere Interesse, die Zeit, die er sich für mich genommen hat, und dafür, daß er mir in mindestens zwei Situationen, in denen ich ratlos war, zu helfen gewußt hat, möchte ich wärmstens Dr. H.Domdey danken.

Ich danke meiner Familie und meiner Lebensgefährtin, Frau M.Moravetz, für ihre permanente Unterstützung, aber vor allem für das bedingungslose Vertrauen, das ich als moralische Grundlage und Kraftquelle auch für diese Arbeit gebraucht habe.

...und ich danke D.R.Hofstadter, der mir die offensichtlichste Selbstbezüglichkeit offenbart hat - das Leben selbst.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen und Symbole.....	9
ZUSAMMENFASSUNG.....	11
EINLEITUNG.....	14
Matrixaufbau.....	14
Biologische Funktionen der Matrix.....	18
Regulation der Biosynthese im Bindegewebe.....	19
Regulierte Genexpression in der Entwicklung des Knorpels.....	20
Untersuchungen des Chondrozytenphänotyps in der Zellkultur.....	24
Regulation der Genexpression von Chondrozyten in Kultur..	27
Vorarbeiten.....	31
AUFGABENSTELLUNG.....	35
RESULTATE.....	37
I. TEIL: REGULIERTE EXPRESSION VON C550.....	37
1. Kolinearität von C550 mit einem RNA-Bereich aus Sterna und Feststellung der Transkriptionsrichtung....	37
2. Absolute Anzahl der C550-RNA Transkripte in Sterna RNA.....	40
3. Expressionsspezifität von C550.....	44
II. TEIL: DAS C550 GEN.....	46
4. Herstellung einer Genbank vom Huhn.....	46
4.1 Einführung.....	46
4.2 Experimentelles Vorgehen.....	47

4.3 Feststellung des Hintergrundes.....	49
5. Screening der primären Genbank für C550-homologe Sequenzen und Amplifikation der Genbank.....	51
6. Charakterisierung der λ CA608-Klone.....	53
6.1 Länge der eukaryotischen DNA.....	53
6.2 Orientierung der eukaryotischen DNA.....	55
6.3 Physikalische Charakterisierung des genomischen Bereichs durch Restriktionsendonukleasen.....	57
6.4 Subklonierungen in Plasmiden.....	59
6.5 Sequenzierung genomischer Bereiche.....	60
7. Untersuchung von Telomerstrukturen.....	61
7.1 Problemstellung.....	61
7.2 Vorexperiment.....	62
7.3 Zielexperiment.....	64
III. TEIL: TRANSKRIPTION DES C550-GENS.....	66
8. Länge und Anzahl der C550 Transkripte.....	66
9. Kodogene Bereiche der genomischen Region und Mindestlänge des Gens.....	67
10. Strukturelle Beziehung der C550-Transkripte zueinander.....	70
IV. TEIL: BAKTERIELLE EXPRESSION VON C550.....	73
11. Strategie zur C550-Antikörper-Produktion.....	73
11.1 Prinzip: Bakterielle Expression von C550.....	73
11.2 C550- β Galaktosidase Fusion zur Optimierung der Expression.....	74
11.3 Wahl des Vektors.....	74
12. pFP1-Konstruktion.....	76
13. Nachweis der Fusion.....	78
13.1 Auf DNA-Ebene.....	78
13.2 Auf Transkriptionsebene.....	78
13.3 Auf Polypeptidebene.....	81
13.3.1 Genetisch.....	81
13.3.2 Biochemisch.....	88

14. Präparative Trennung der pFP1-Peptide.....	91
14.1 Anreicherung über pAPTG-Sephrose.....	91
14.2 Vollständige Reinigung über nicht-denaturierende Elektrophorese.....	94
15. Anzahl und Eigenschaften der pFP1-Peptide <i>in vivo</i>	95
16. pFP2-Konstruktion.....	98
17. Nachweis der pFP2-Polypeptidsynthese.....	102
18. Präparative Isolierung der pFP2-Polypeptide.....	103
 V. TEIL: DAS C550-HUHNPROTEIN.....	105
19. Herstellung von Anti-C550-Antikörpern.....	105
20. Nachweis des C550-Huhnproteins in Gewebeextrakten...	107
 DISKUSSION.....	109
 I. TEIL: ZUR EXPRESSIONSREGULATION VON C550.....	110
1. cDNA/RNA-Kolinearität.....	110
2. Transkriptionsrichtung.....	111
3. Häufigkeit der C550-RNA.....	112
4. Regulierte Expression von C550.....	114
 II. TEIL: ZUM GEN UND ZUR TRANSKRIPTION VON C550.....	116
5. Genstruktur.....	116
6. Genlänge und mRNA-Bildung.....	117
7. Genanzahl von C550.....	119
8. "Chromosome-walking" und Telomeruntersuchung.....	121
 III. TEIL: ZUR BAKTERIELLEN EXPRESSION VON C550.....	123
9. Bakterielle Expression von C550: Konzept.....	123
10. C550-Expression in pUC9.....	126
10.1 pFP1-Expressionsanalyse.....	126
10.1.1 Nachweis der Transkription.....	126



10.1.2 Nachweis der Translation.....	127
10.2 Reinigung der <i>in vivo</i> synthetisierten pFP1-Peptide.....	129
10.3 pUC9 als Expressionsvektor.....	130
11. pFP2-Expression.....	132
 IV.TEIL: ZUM C550-HUHNPROTEIN.....	136
 12. Immunisierung mit pFP2 und Entdeckung des C550-Huhnproteins.....	136
 MATERIALIEN UND METHODEN.....	138
 Puffer, Lösungen und Medien.....	138
Genotypen.....	140
Molekulargewichtsmarker.....	140
Allgemeine Methoden.....	141
Präparation und Analyse von DNA.....	148
Präparation und Analyse von RNA.....	175
Nukleinsäurehybridisierungen.....	178
Präparation und Analyse von Proteinen.....	183
Immunologische Methoden.....	189
Mathematische Berechnungen.....	193
 LITERATUR.....	198
 LEBENS LAUF.....	214

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

(ss)DNA	(Einzelstrang)Desoxyribonukleinsäure
(m)RNA	(messenger)Ribonukleinsäure
bp	Basenpaar(e)
kb	Kilobasen
rRNA	Ribosomale RNA
DNase	Desoxyribonuklease
RNase	Ribonuklesase
(d)NTP	(Desoxy)Nukleosid-5'-triphosphat
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
(d)ATP	(Desoxy)Adenosin-5'-triphosphat
(d)GTP	(Desoxy)Guanosin-5'-triphosphat
(d)CTP	(Desoxy)Cytidin-5'-triphosphat
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
E.coli	Escherichia coli
r (hochgestellt)	resistent
s (hochgestellt)	sensitiv
pC550	Das Plasmid pC550, mit dem cDNA-Insert C550
C550	Je nach Kontext: das cDNA-Insert, das C550-Gen, die C550-komplementären RNAs, oder das C550-Protein
BAP	Bakterielle alkalische Phosphatase
CIP	Kalbsdarm-Phosphatase
PEG	Polyäthylenglykol
cfu	Kolonien-bildende Einheiten
pfu	Plaques-bildende Einheiten
cpm	Impulse pro Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
DTT	Dithiothreitol

BPB	Bromphenolblau
XC	Xylencyanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	[Äthylen-bis(oxyäthylennitril)]- tetraessigsäure
NTA	Nitrilotetraessigsäure
BSA	Rinderserum Albumin
U	Enzymeinheiten
Gly	Glyzin
pAPTG	Para-Amino-Phenyl-Thio-Galaktopyranosid
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-Galaktopyranosid
IPTG	Isopropyl-Thio-Galaktopyranosid
X Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Galaktopyranosid
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
kd	Kilodalton
PAA	Poly-Akrylamid
Bis	Methylen-Bis-Akrylamid
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
APS	Ammoniumpersulfat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
NEM	N-Äthylmaleimid

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von einem cDNA-Klon, genannt pC550, wurden in dieser Arbeit erste Schritte zur Aufklärung der Genomstruktur und zum Verständnis der Expression eines Huhngens ausgeführt. Die erhaltenen Informationen und die Aussagen über diese Aspekte lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Zur C550-Expression:

- Es wurde nachgewiesen, daß das pC550-Insert kolinear zu einem RNA-Teil aus Huhn-Sterna ist. Die Transkriptionsrichtung bezüglich der Restriktionsendonukleasestellen auf der cDNA wurde festgestellt.
- Die C550-RNA, deren Synthese in der Zellkultur mit dem Chondrozyten-Phänotyp assoziiert ist (1), wird in vivo in Sterna-Knorpel konstitutiv exprimiert. Die C550-RNA wird aber in unterschiedlichem Ausmaß auch in anderen Bindegeweben synthetisiert; sie unterliegt einer entwicklungsabhängigen Regulation. Gewebe ekto- und endodermalen Ursprungs (Hirn, Leber) zeigen eine reduzierte C550-RNA Synthese.
- pC550 repräsentiert eine seltene RNA; letztere macht in 12 Tage alten embryonalen Sterna rund 0.01% der Total-RNA aus.

Zum C550-Gen und seiner Transkription:

- Um das C550-Gen zu erfassen, wurde eine Genbank aus Calvarien-DNA im Phagenvektor λ Charon 4A konstruiert, und rekombinante Klone wurden identifiziert.

- Die isolierten Klone wurden durch Restriktionsendonukleasespaltungen und partielle Sequenzierung charakterisiert. Die Verteilung der Restriktionsendonukleasestellen weist keine interne Sequenzrepetition auf. Ein Bereich mit sehr hohem GC-Gehalt (>80%), der vermutlich eine funktionelle Bedeutung hat, wurde identifiziert. Die Vermutung der Genlokalisierung in der Nähe eines Telomers konnte ausgeschlossen werden. Zusammen mit Klonen, die aus einer Sterna-Genbank isoliert worden waren (2), wurden auf diese Weise 28 kb genomischen Bereiches erfaßt.
- Die gesamte erfaßte Region gehört zum C550-Gen. Die Prozessierung von primären Transkripten führt zu zwei RNA-Spezies mit 6.5 und 4.4 kb. C550 ist zu beiden RNAs homolog. Die unterschiedliche Länge der zwei RNAs ist wahrscheinlich auf differenzielle Polyadenylierung eines gemeinsamen Vorläufers zurückzuführen. Die zwei RNAs scheinen für das gleiche Polypeptid zu kodieren.

Zur Identifizierung des C550-Huhnproteins:

- Das natürliche Huhnprotein wurde durch Antikörper entdeckt, die gegen den C550-Proteinanteil gerichtet waren. Dazu wurde C550 als N-terminale *lacZ* Fusion im Vektor pUC9 und dann in pMC1871 in *E.coli* exprimiert. Die pUC9-Konstruktion (pFP1) hat die Expressionsanalyse ermöglicht und vereinfacht; durch die Expression mittels des pMC1871 Vektors (pFP2) wurde die Ausbeute optimiert.
- Expression von variablen C550-Teilen in *E.coli* führt zu vier verschieden langen Fusionspeptiden mit β Galaktosidase. Damit wurden Kaninchen immunisiert, und die Produktion von spezifischen Anti-C550 Antikörpern wurde nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde das natürliche C550-Huhn Protein mit einem Molekulargewicht

von 155 kd identifiziert.

Das Expressionsmuster, die Genstruktur und die vorläufigen Proteindaten von C550 lassen sich mit keinem bekannten Bestandteil des Bindegewebes korrelieren. Es erscheint daher der Schluß zulässig, daß es sich beim C550-System um eine neue Komponente des Bindegewebes handelt.

EINLEITUNG

Gegenstand der vorliegenden Dissertation sind Aspekte der Expression eines Gens im Bindegewebe des Huhns. Das Stütz- und Bindegewebe ist eine der vier großen Gewebsgruppen der Metazoen. Dazu werden Elemente des Körpers gezählt, die ihm Form und Stütze verleihen, aber auch Stoffwechsel und Abwehraufgaben erfüllen (3). Es sind dies zum einen Bestandteile mit fester Form, wie Knochen und Knorpel, oder weniger formfeste Teile, wie Sehnen und die Lederhaut (Dermis). Stützfunktion hat das faserige Material, das Gefäße, Nerven und andere Organe umhüllt, bzw. das Parenchym durchdringt, die weichen und harten Hirnhäute liefert und überall dort vorkommt, wo zwischen den Organen Fugen auszufüllen sind. Das Bindegewebe schließt noch zum anderen spezielle Körperbereiche ein, wie das Retikulum, das Fettgewebe und auch "freie Zellen", wie Makrophagen und Leukozyten.

Das Bindegewebe zeichnet sich durch eine extrazelluläre Matrix aus. Alle Zellen der verschiedenen Bindegewebe, welche die Matrix synthetisieren und ablagern, leiten sich von den Mesenchymzellen ab (3). Als Mesenchym bezeichnet man das embryonale Bindegewebe. Die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten der pluripotenten Mesenchymzelle sind in Abb.1 skizziert.

MATRIXAUFBAU

Die organischen Komponenten der Bindegewebsmatrix gehören zu den Stoffklassen der Glykoproteine, Proteoglykane und sauren Kohlenhydraten. Die Hauptglykoproteine sind die ver-

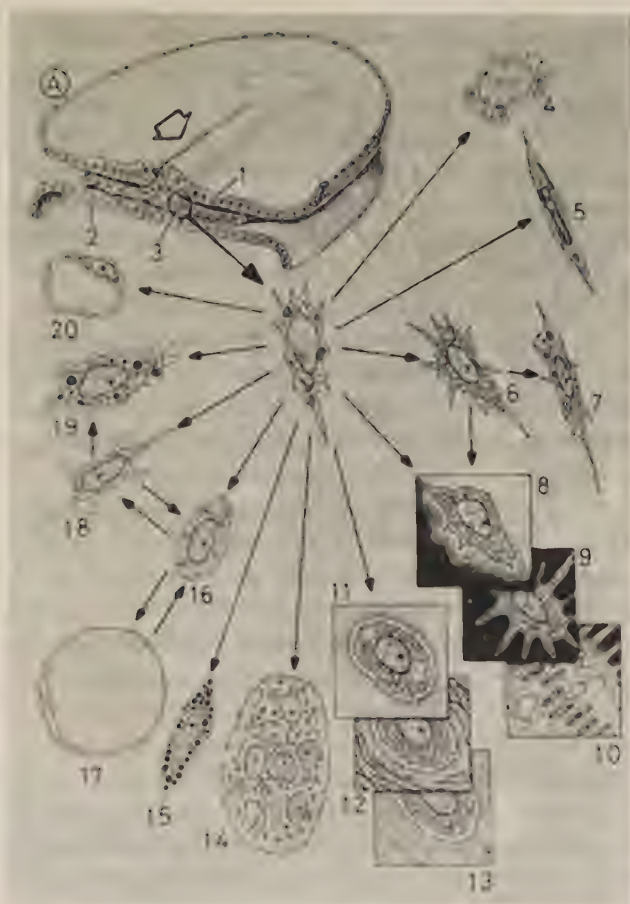


Abb. 1: Differenzierungsmöglichkeiten der Mesenchymzelle (aus (3)). Im oberen Bildteil werden die drei Keimblätter der Gastrula gezeigt: 1: Ektoderm, 2: Endoderm, 3: Mesoderm. In der Bildmitte befindet sich eine embryonale Mesenchymzelle; die Differenzierungsrichtung und Umwandlungsmöglichkeiten der Zellen werden mit Pfeilen angezeigt; 4: Hämocyteblast, 5: Muskelzelle, 6: Fibroblasten, 7: Fibrozyten, 8: Osteoblasten, 9: Osteozyten, 10: Odontoblasten, 11, 12, 13: Chondrozyten des hyalinen, elastischen und faserigen Knorpels, 14: Chondro- bzw. Osteoklasten, 15: Mastozyten, 16: Lipoblasten, 17: Adipozyten, 18: Retikulumzellen, 19: Histiocyten bzw. Makrophagen, 20: Endothelzellen.

schiedenen Kollagene. Es sind mindestens zehn distinkte Kollagentypen bekannt (für eine Übersicht s. (4,5a,6,7a,8)). Die kleinste funktionelle Einheit, das Tropokollagen, hat eine besondere Tertiärstruktur: Drei Polypeptidketten - genannt α -Ketten - lagern sich in der Form einer rechtshändigen Helix an, indem sie sich durch linkshändige Drehung ihrer eigenen Achse umeinander winden (9a). Diese Tertiärstruktur wird durch die spezielle Aminosäuresequenz der einzelnen Ketten ermöglicht; sie kann durch die Formel $(\text{Gly} - \text{X} - \text{Y})_n$ wiedergegeben werden, wobei die Stellen X und Y häufig von Prolin und Hydroxyprolin besetzt sind. Hydroxyprolin ist eine für Kollagen charakteristische Aminosäure, die durch posttranslationale Modifikation entsteht (10). Die Tripelhelix kann aus drei gleichen, oder zwei gleichen und einer verschiedenen α -Ketten bestehen (Beispiel für ein Homotrimer: Typ II Kollagen, Formel: $\alpha 1(\text{II})_3$; für ein Heterotrimer: Typ I Kollagen, Formel: $\alpha 1(\text{I})_2 \alpha 2(\text{I})$). Die Anzahl der Repetitionen n beträgt bei den am besten untersuchten interstitiellen Kollagenen, Typ I, II und III, 338 - 341 (7a). Die helikale Struktur der anderen Kollagene ist durch mehr oder weniger lange, nichthelikale Bereiche unterbrochen (6).

Das Vorkommen der Kollagene ist ubiquitär (4). Andere Strukturelemente der Matrix, deren Expression spezifischer für das jeweilige Bindegewebe zu sein scheint, sind die nicht-kollagenen Glykoproteine, wie Fibronektin (9b,11-13), Laminin (9b,12-14) und Chondronektin (12,15). In Vertebratengeweben, die zugelastisch sein müssen, wie Haut und Gefäße, ist die Hauptkomponente der elastischen Fasern das Protein Elastin (5b,9c,16). Elastin gehört zu den amorphen Bestandteilen der Matrix.

Morphologisch unstrukturiert erscheinen auch die **Proteoglykane**; sie sind typische Bestandteile der extrazellulären Matrix, die in wechselnden Mengen in allen Bindegeweben vorkommen (9d,17). Die Proteoglykane sind eine heterogene

Molekülklasse mit einem Molekulargewicht von 50 bis einigen Millionen kd. Im allgemeinen bestehen sie aus einem zentralen core-Protein, an dem mehrere Kohlenhydratketten kovalent gebunden sind; Sie stellen 50 - 95% der Gesamtmasse dar. Unter ihnen sind Oligosaccharide, die auch in den Glykoproteinen gefunden werden (N-Acetylglukosamin, Mannose, Galaktose, Sialinsäure) (9b,9d); charakteristisch für die Proteoglykane sind aber lange Glykosaminoglykanketten, wie Polymere von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat u.a. Fast 90% aller Proteoglykane sind durch das eine Ende des core-Proteins und mit Hilfe des sogenannten link-Proteins an Hyaluronsäure nichtkovalent verbunden. Hyaluronsäure ist ebenfalls ein langkettiges, unverzweigtes Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix (9d).

Die einzelnen Bestandteile der Matrix liegen in einer speziellen Anordnung vor, die sie durch Wechselwirkungen miteinander und mit den Bindegewebszellen erlangen. Von den Kollagenen werden einige makromolekulare Strukturen gebildet, die charakteristisch für den jeweiligen Typ sind (6,7a,8,18a): Die Kollagene I, II und III bilden z.B. Fibrillen, die von begrenztem Ausmaß sind (wie z.B. im Knorpel), oder zu langen und dicken Fasern auswachsen können (z.B. in Sehnen) (19,79,80); die Aggregation von Typ IV Molekülen führt zu einer Netzstruktur; und durch komplexe Interaktionen zwischen Typ VI Kollagen-Molekülen entstehen Mikrofibrillen (Filamente). Diese Strukturen entstehen im wesentlichen durch Wechselwirkungen der Tropokollagenmoleküle untereinander (9a); Moleküle anderer Stoffklassen, wie z.B. Proteoglykane, können die Fibrillenmorphologie beeinflussen (20-25). Makromolekulare Kollagenstrukturen werden durch kovalente, intra- bzw. intermolekulare Bindungen stabilisiert (6,10). Durch Ablagerung von anorganischen Kalziumsalzen zwischen den Tropokollagenmolekülen (wie z.B. in den Knochen (9e,26)) wird der Bindegewebsmatrix größere Festigkeit verliehen. Membranproteine mit Rezeptorfunktion können die Bindung der Bindegewebszellen an der

extrazellulären Matrix vermitteln (12,13,27-29).

BIOLOGISCHE FUNKTIONEN DER MATRIX

Die extrazelluläre Matrix verleiht dem Bindegewebe seine biomechanischen Eigenschaften (30). Die nötige Zugfestigkeit in der Sehne wird z.B. durch die Kollagenfasern vermittelt; die Rigidität der Knochen resultiert aus der Mineralisierung des extrazellulären Raumes (31); und die kombinierte Aktion von Kollagenfibrillen und hydrierten Proteoglykanen ist für die Druckelastizität des Gelenkknorpels verantwortlich (32). Die Proteoglykane wirken auch als physiologische Barriere für die freie Diffusion und den Fluß von Makromolekülen durch das Bindegewebe (9d,33).

Außer den offensichtlichen mechanischen Funktionen besitzt die Matrix die Fähigkeit, das Zellverhalten in mancherlei Hinsicht zu modulieren und zu beeinflussen: Matrixkomponenten können die Gewebsdifferenzierung während der Ontogenese bestimmen (9f); in diesem Zusammenhang wurden z.B. das Typ II Kollagen (34,35) und Glykosaminoglykane (35,36) als Induktoren der Chondrogenese in den Somiten erkannt. Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel ist die Identifizierung einer Proteinfunktion aus adultem Knorpel, die das Eindringen von Gefäßen in das Gewebe verhindert (37).

Matrixbestandteile können die Entwicklung von Zellen umprogrammieren: Unter dem Einfluß von demineralisiertem Knochen (38), oder Knochenextrakt (39), entstehen aus Mesenchymzellen, die bei mittlerer Dichte gesät wurden, *Chondrozyten*, was bei dieser Dichte normalerweise nicht geschieht (40). Aus Knochen konnten kürzlich zwei Faktoren isoliert werden, welche die Chondrogenese verursachen (41).

Solche Induktionsmechanismen müssen in vivo bei **Regenerationsvorgängen** aktiviert werden, wenn z.B. bei der Bruchheilung von Knochen aus undifferenzierten Zellen des Periosts der Knorpel entstehen soll, der die beiden Bruchteile verbindet (3,9f).

Matrixkomponenten (Kollagen, Fibronektin) sind bei der Wundheilung beteiligt, wo sie durch ihre chemotaktischen Eigenschaften die Ansammlung von Zellen evozieren, welche die Wundstelle reinigen und das Bindegewebe wieder aufbauen (42).

Obwohl die Signifikanz der extrazellulären Matrix hinsichtlich der Zellphysiologie bzw. phänotypischen Expression, wie in den genannten Prozessen, einwandfrei demonstriert worden ist, bleibt die molekulare Wirkungsweise der Matrixkomponenten weitgehend Gegenstand der Spekulation.

REGULATION DER BIOSYNTHESE IM BINDEGEWEBE

Eine Bedingung für die Ausübung der verschiedenen Funktionen des Bindegewebes ist die adäquate Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Dies wird vor allem durch die Regulation der biosynthetischen Aktivität der Bindegewebszellen erreicht. Die Expression der Proteinkonstituenten der Matrix kann direkt durch Regulation des Nukleinsäuremetabolismus, ihrer posttranslationalen Modifikationen, oder ihres Abbaus kontrolliert werden. Die Kollagenproduktion ist besonders intensiv untersucht worden und es sind einige Faktoren bekannt, welche den Typus, die Quantität und die Qualität der synthetisierten Kollagene beeinflussen können (7b,43,44a,44b,45,46). Darunter befinden sich körpereigene Substanzen, wie Hormone (7b,46-51) und Interferon (52,53), sowie die Matrixkomponenten selbst (54,55), und exogene

Faktoren, wie Vitamine (10,26,56-58) und Metallionen (59,60). Der Ansatzpunkt von einigen Agenzien konnte gezeigt werden, wie z.B. von γ -Interferon, das die Typ I RNA-Nettosynthese reduziert (52,53), oder von Ascorbat, das u.a. auf die Prolin- und Lysinhydroxylierung als Cofaktor einwirkt (10,114). Aus Zellkulturexperimenten kennt man ferner Bedingungen, wie Wachstumsphase (61,63) bzw. Zelldichte (64), die ebenso für das Syntheseprofil der Bindegewebszellen entscheidend sind.

Ausfall der Expressionskontrolle führt zu Erkrankungen des Bindegewebes (7d,16,17,46,65). Bei fibrotischen Prozessen, von denen fast alle inneren Organe befallen werden können, ist die Menge der produzierten Matrix unphysiologisch erhöht (7b,65). Ein Teil der Arthrosen ist durch die Synthese der falschen Matrixkomponenten charakterisiert (7d). In einigen Fällen von defektem Kollagenmetabolismus bei erblichen Erkrankungen ist es möglich gewesen, die molekulare Ursache zu identifizieren (67).

REGULIERTE GENEXPRESSION IN DER ENTWICKLUNG DES KNORPELS

Der Knorpel bildet im adulten Tier im wesentlichen Teile des Skeletts; dort ist er an den Gelenkendigungen zu finden, wo er als Stoßpolster für Druckelastizität sorgt. Außerdem sind das Sternum und Rippenbereiche, die Trachealringe, die Zwischenwirbelscheiben, der Meniskus und das elastische Material von Nase und Ohrmuschel aus Knorpelgewebe. Zusätzlich zu den mechanischen Funktionen hat der Knorpel eine wichtige Aufgabe in der Ontogenese: Er ist der "Platzhalter" im Embryo für die meisten späteren knöchernen Skeletteile (s.unten).

Im Knorpel findet man die Bindegewebszellen (Chondro-

zyten) umhüllt von einer amorphen Matrix (3,68a). Der Hauptbestandteil der Matrix ist Wasser (7d). Für die starke Wasserbindung sind die sauren Glykosaminoglykane verantwortlich (9d). Im adulten Knorpel findet man das dafür charakteristische Chondroitinsulfat-proteoglykan ("Typ IV") mit einem Molekulargewicht von $1 - 2 \times 10^3$ kd (69) und mindestens zwei weitere Proteoglykane mit einem kleineren Molekulargewicht (70,71). Diese bilden mit der Hyaluronsäure Aggregate, die ein Molekulargewicht von bis zu 200×10^3 kd erreichen (72).

Das dominante und charakteristische Knorpelkollagen ist das Typ II Kollagen (73). Weitere Kollagentypen in kleineren Mengen (18b,68b), sowie andere, nichtkollagene Proteine im Knorpel sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Es wird unterschieden zwischen hyalinem, elastischem und faserigem Knorpel (3), wobei das strukturierte Erscheinungsbild der Matrix in der angegebenen Reihenfolge zunimmt; verantwortlich dafür ist die unterschiedliche Stärke und Anordnung der Kollagenfibrillen. Dem Knorpel fehlen Nervenbahnen, Blut- und Lymphgefäße; dies macht seinen Stoffwechsel ganz von der Diffusion abhängig (7c,68c).

Die Chondrozyten sind hochdifferenzierte Zellen, welche, so wie alle Bindegewebszellen, aus Mesenchymzellen entstehen. Am Prozeß der enchondralen Ossifikation in den Gliedmaßen (3,81-83) lassen sich die verschiedenen physiologischen Zustände und morphologischen Veränderungen der Chondrozytenentwicklung in vivo verfolgen: Außer den Cranialknochen und dem Schlüsselbein entstehen alle anderen Teile des Knochenskeletts aus Knorpelanlagen. Die Bildung des Knorpels wird initiiert durch die Kondensation des Mesenchyms an mehreren Stellen (68d). In diesen begrenzten Bezirken ("Skleroblasteme") synthetisieren die sternartigen Mesenchymzellen zunächst Typ I Kollagen, Fibronektin und Hyaluronsäure (84,85). Am Beginn der Knorpeldifferenzierung

Kollagene *)

Typen	Vorkommen	Lokalisation
Typ I	hyaliner elastischer faseriger Zwischenwirbelscheibe	Oberfläche von Gelenkknorpel Ohrmuschel, assoz. mit Chondrozyten Meniskus Annulus fibrosus
Typ II	hyaliner elastischer faseriger	} extrazelluläre Matrix
Typ III	faseriger	
Typ V	hyaliner? faseriger	perizelluläre Matrix
Typ VI	hyaliner?	perizelluläre Matrix
Typ IX	hyaliner elastischer Zwischenwirbelscheibe	perizelluläre Matrix Zellzone
Typ X	hyaliner	hypertrophische Zone
1 α 2 α 3 α	hyaliner elastischer faseriger (3 α) Zwischenwirbelscheibe	perizelluläre Matrix Zellzone perizelluläre Matrix

Nichtkollagene Proteine

Bezeichnung	Molekulargewicht (kd)	Referenz
link-Protein	45	74
-	35	75
-	52	76
Chondrocalzin	35	77
Chondronektin	80	15
-	180	78
-	60	120

Tabelle 1: Charakteristische Glykoproteine des Knorpels.

*): Nach (18b), modifiziert.

verschwinden dann Typ I Kollagen und Fibronektin, und die Hyaluronsäure wird reduziert (86); dafür kann man die Synthese des knorpelcharakteristischen Typ II Kollagens (84,85) und Chondroitinsulfat-Proteoglykan nachweisen (87). Die Zellen werden durch die massive Ablagerung der Matrix abgerundet. Diese Embryonalanlagen nehmen durch die Matrixsynthese der inneren Zellen und die Apposition neuer Mesenchymzellen auf die Peripherie an Volumen zu (68e). Am Ende der Chondrogenese bleiben abgeflachte Mesenchymzellen als "Perichondrium" bei allen Knorpeln (außer dem Gelenkknorpel) auf der Oberfläche erhalten. Als solche synthetisieren sie weiterhin Typ I Kollagen (88).

Körperteile, die den *adulten* Knorpel bilden, haben scheinbar eine ähnliche Entwicklung wie die Knochenanlagen bis zu dieser Stufe (7c); sie weisen eine geringe metabolische Aktivität auf (68c). Die Chondrozyten in den Knorpelanlagen der Skelettknochen durchlaufen hingegen ein "Alterungsstadium": dabei nimmt das Zellvolumen zu ("Hypertrophie"), und die Knorpelmatrix wird mineralisiert (3,68e,68f,81-83). Für die hypertrophischen Chondrozyten ist die Produktion von Typ X Kollagen charakteristisch (89,90), welches in anderen Knorpeln nicht gefunden wird (91). Durch die Mineralisierung wird die Stoffdiffusion vollständig unterbunden, und die hypertrophischen Chondrozyten sterben ab; die Knorpelanlage wird abgebaut und durch Knochen ersetzt. Lediglich der Knorpel auf der Gelenkoberfläche wird ausgespart.

Die Expression der jeweils nötigen Art und Menge der extrazellulären Bestandteile zu jedem Zeitpunkt der Knorpelentwicklung ist Gegenstand einer feinen Regulation durch Umweltfaktoren und Matrixkomponenten (68g,92), Hormone und Wachstumsfaktoren (68h,68i), oder durch direkte Zell-Zell Wechselwirkungen (68j,93). Diese charakteristischen Veränderungen im Synthesespektrum demonstrieren eine ausgeprägte differenzielle Genaktivität der Chondrozyten während der Ontogenese.

UNTERSUCHUNGEN DES CHONDROZYTENPHÄNOTYPS IN DER ZELLKULTUR

In Hinblick auf die niedrige metabolische Aktivität und begrenzte Zugänglichkeit der Knorpelzellen in situ sind Zellkultursysteme von Chondrozyten entwickelt worden, um ihre Physiologie leichter und direkter zu studieren. Mit Hilfe dieser Systeme können zum einen charakteristische Komponenten erfaßt werden, die andernfalls einer Detektion im Gewebe entgangen wären; zum anderen ist es in der Zellkultur möglich, epigenetische Faktoren, welche die Chondrozytenphysiologie modulieren, zu erkennen und ihre Wirkungsweise zu analysieren.

Kultivierte Knorpelzellen sind labil (7c); sie verändern leicht ihren Metabolismus und/oder ihre Morphologie: Mit fortschreitender Zeit verlieren sie als Monolayerkultur (bei niedriger Zelldichte) spontan ihre sphärisch-polygonale Gestalt und werden zu bipolaren, fibroblastenähnlichen Zellen (s.Abb.2). Die Synthese der charakteristischen

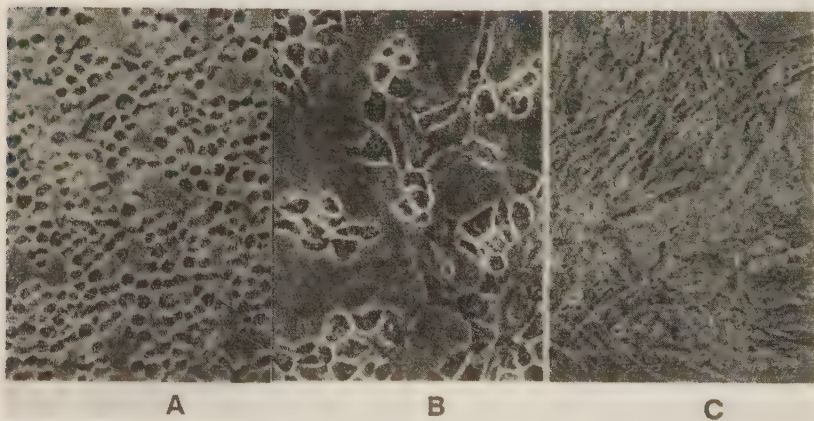


Abb.2: Aufnahme von Chondrozyten nach A: 1 Tag, B: 1 Woche und C: 6 Wochen in Kultur (s.(1)).

Moleküle, Typ II Kollagen und Chondroitinsulfat-Proteoglykan wird ausgeschaltet; dafür wird die Produktion von Typ I Kollagen, Fibronektin und einem Proteoglykan mit niedrigerem Molekulargewicht aktiviert (69,94-102). Da dieser Zustand der Physiologie der undifferenzierten Mesenchymzellen ähnelt, aus denen die Chondrozyten hervorgegangen sind, spricht man von "Dedifferenzierung" der Chondrozyten.

Ausgehend vom System der spontanen Dedifferenzierung sind Kulturbedingungen ausgearbeitet worden, die den Chondrozyten-Phänotyp *stabilisieren* bzw. den Prozeß *beschleunigen*. Die Chondrozyten behalten z.B. ihre Zellform und sekretorischen Eigenschaften über längere Zeit, wenn durch Kultivierung in flüssigem bzw. semisolidem Medium ein Wachstum ohne feste Verankerung erzwungen wird (103-106). Die Dedifferenzierung, die (im Monolayer) spontan mehrere Wochen dauert (69,94-96,99), kann durch verschiedenartigste Behandlung entscheidend beschleunigt werden; sie ist z.B. durch Bromdesoxyuridin-Behandlung der Zellen nach drei Tagen komplett (97,107). Andere Möglichkeiten sind in Tabelle 2 angegeben. Diese Manipulationen der Chondrozyten führen, außer zur Formveränderung, grundsätzlich zur Abschaltung oder drastischen Reduzierung der Typ II Kollagen-Produktion und zur Aktivierung der Typ I Kollagen-Synthese. Anscheinend reflektiert also die Typ II Expression einen differenzierten Status, der hochsensitiv gegenüber äußeren Einflüssen ist. Weitere biochemische Veränderungen, die charakteristisch für die jeweilige Behandlung sind, betreffen ebenfalls die Qualität und Menge anderer Chondrozyten-Produkte; darunter fällt die Abnahme der 1α , 2α , 3α Kollagene (116), des Typ X Kollagens (121), des Chondroitinsulfat-Proteoglykans (78,110,118,120), des link-Proteins und einiger, nicht näher charakterisierten 60, 80, bzw. 180 kd-Proteine (78,120), und die Expressionsaktivierung von Typ I-Trimeren (94,107,109), Typ III (94,113,115) und Typ V Kollagen (116), sowie von Fibronektin (100,119-121), Hyaluronsäure (123), und von modifizierten Proteoglykanen (69,98,102,124). Bezüglich der

Kulturbedingungen	Referenz
Monolayer (mittlere Zelldichte)	69
Lange Zeit in Kultur	94 - 102
Zellteilungsinhibition	108
Physiologische Substanzen	
ganzer Embryoextrakt	109
Fibronektin	110
Ca ⁺⁺ (cAMP)	111, 112
Vitamin A	113
Vitamin C	115
Unphysiologische Substanzen	
Brom-Desoxyuridin	97, 107, 116
Phorbol-Myristatazetat	78, 117
RSV-Transformation (src)	118 - 122

Tabelle 2: Kulturbedingungen und Faktoren, die die Chondrozyten-Dedifferenzierung begünstigen.

Morphologieveränderung konnte eine eindrucksvolle Umorganisation von Aktin- und Vinkulin-Filamenten am Prozeß des cell spreading und nach RSV-Transformation (125), sowie eine Synthesezunahme von β -Aktin und Fibronektin nach Phorbol-Myristatazetat-Behandlung (66) demonstriert werden. Experimentelle Evidenz ist vorhanden, wonach Elemente des Zytoskeletts in einer *ursächlichen* Beziehung zur Zellphysiologie, bzw. Entwicklung stehen (66,126,127g,129); das Zytoskelett könnte u.a. zwischen Veränderungen im äußeren Milieu (Matrix, Substrat) und der Zellreaktion vermitteln, da es durch Transmembranproteine mit dem extrazellulärem Raum in Verbindung steht (128).

Indes ist der Begriff der "Dedifferenzierung" etwas ungenau: Trotz der Ähnlichkeiten verwandeln sich die Chondrozyten nicht zu den embryonalen Mesenchymzellen zurück, die

mehrere Differenzierungsmöglichkeiten hatten (vgl. Abb. 1); in den Fällen, in welchen die "Dedifferenzierung" reversibel ist (vgl. (7c, 78, 109, 110, 113, 115, 117, 118, 120, 129)), können sie nur zu ihrem ursprünglichen Chondrozyten-Phänotyp revertieren. Es handelt sich also vielmehr um eine *Degeneration*, die offensichtlich auf den Verlust der natürlichen Umgebung zurückgeht. In diesem Zusammenhang darf die (soweit bekannt) erworbene Bindegewebserkrankung Osteoarthritis Erwähnung finden - eine degenerative Erscheinung des Gelenkknorpels (7d). Beim osteoarthrotischen Knorpel ist die Produktion von Typ I und III Kollagen im perizellulären Raum der Chondrozyten durch Immunfluoreszenzstudien gezeigt worden (130). Vermutlich initiiert dies die Desorganisation und Zerstörung der Matrix, die letztlich zur Verknöcherung des Gelenks führt. Es ist attraktiv anzunehmen, daß die Erforschung und das Verstehen der Dedifferenzierung eine künftige Heilung, oder zumindest Kausalbehandlung der Symptome bei den Patienten, in Aussicht stellen könnte.

REGULATION DER GENEXPRESSION VON CHONDROZYTEN IN KULTUR

Auf Grund der drastischen-Veränderung in der Expression von Proteinkomponenten der Matrix und des relativ leichten Nachweises ist die Chondrozyten-Dedifferenzierung ein geeignetes Modell, an dem die Genregulation dieser Komponenten studiert werden kann. Die Physiologie der Chondrozyten in der Zellkultur und während der Chondrogenese zeigt einige Parallelen:

- (1) Wie beim Dedifferenzierungsprozeß wird die Reifung der Chondrozyten in situ (vgl. oben) auch durch eine Umschaltung in der Synthese von Kollagenen, Proteoglykanen und anderen extrazellulären Glykoproteinen charakterisiert.

- (2) Es ist bekannt, daß einige Agenzien, welche die Dedifferenzierung begünstigen, die Chondrogenese inhibieren (131-135).

Diese Ähnlichkeiten berechtigen zu der Annahme, daß im Prinzip die gleichen Mechanismen der Regelung, die im artifiziellen System der Zellkultur entdeckt und analysiert werden, auch im lebenden Tier wirksam sind.

Molekulare Untersuchungen der Expressionskontrolle auf der Ebene der Nukleinsäuren setzten voraus, daß cDNA- und genomische Klone der Komponenten, die am Prozeß der Dedifferenzierung beteiligt sind, zur Verfügung stehen. In den letzten Jahren wurden die Gene von einigen Proteinkomponenten, die von Knorpelzellen exprimiert werden können, ganz oder teilweise isoliert und charakterisiert (einige Kollagengene (127a-e, 136, 137) und das Fibronektin (138)). Eine vergleichende Darstellung der Struktur der $\alpha 2(I)$ und $\alpha 1(II)$ -Gene des Huhns sind in Abb.3 widergegeben. Die Typ I, II und III Kollagengene zeichnen sich durch ihre Größe und das häufige Vorkommen von langen Introns aus; das Typ II Gen ist kompakter, da die Intronlänge reduziert ist (127c, 139, 140). Es wurde vermutet, daß dies die geringste Länge ist, bei der noch ein korrektes splicing dieser mRNA erfolgen kann (140). Besonders auffällig und interessant ist die

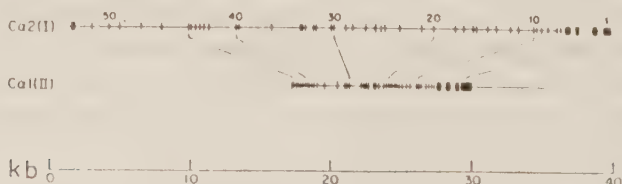


Abb.3: Schematische Darstellung der $\alpha 2(I)$ und $\alpha 1(II)$ Kollagengene von Huhn. Exons werden als schwarze Rechtecke oder senkrechte Linien abgebildet, Introns als waagerechte Linien. Die Nummerierung der Exons vom 3'-Ende aus ist über $\alpha 2(I)$ angegeben (von (127c)).

Länge der meisten Exons, die sich als Vielfaches von 54 bp präsentieren (entsprechend sechs Repetitionen der Aminosäuresequenz Gly - X - Y) (141). Dies hat zu vielfältigen Spekulationen über die Bedeutung dieser Einheit für die Evolution, bzw. Physiologie geführt (141-143). Andere Kollagengene weisen jedoch eine vom 54 bp-Muster abweichende Struktur der Exons auf, was für eine unterschiedliche Evolution spricht (127d-f,136,137,144-147). Das $\alpha 2(I)$ Gen besitzt eine TATA und CAAT Box, wie die meisten eukaryotischen Gene (127e,136,148). An seinem Promotor erlaubt die DNA-Sequenz die Ausbildung von vier Haarnadelstrukturen (148), die vielleicht von Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Die Struktur des $\alpha 1(II)$ Promotors vom Huhn ist noch nicht bekannt. Vom Promotor des $\alpha 1(II)$ Gens der Ratte wurde aber berichtet, daß einige DNA-Sequenzen vor dem Transkriptionsstart Homologien zu enhancer-Elementen besitzen (149). Solche Sequenzen könnten eine Rolle bei der gewebsspezifischen Expression dieses Gens spielen.

Einige Erkenntnisse über die genetischen Regulationsmöglichkeiten im System der Chondrozyten-Dedifferenzierung wurden hauptsächlich durch die Analyse der Typ I und II Kollagengen-Expression gewonnen: Bestimmungen der RNA-Menge haben ergeben, daß die Abnahme von Typ II und die Zunahme von Typ I Kollagen mit quantitativen Veränderungen der jeweiligen RNAs positiv korreliert (1,117,120,150-152). Die mRNA-Menge ist für Fibronectin ebenfalls der limitierende Faktor (120,152). Durch Untersuchungen in *Fibroblasten* ist gezeigt worden, daß die Variationen der Typ I-mRNA Menge direkte Veränderungen in der Transkriptionsrate reflektieren (153). Es wird also angenommen, daß die Regulation dieser Hauptkomponenten im wesentlichen durch Kontrolle der Transkription oder des mRNA-turn over erfolgt. Da die DNA-Methylierung bei der Transkriptionskontrolle einiger Gene impliziert wurde (154), ist das Methylierungsmuster der Kollagengene untersucht worden (155). Das Typ II Gen ist in normalen Chondrozyten - verglichen mit nichtexprimierenden

Zellen - untermethyliert; die Methylierung nimmt jedoch nicht zu, wenn die Chondrozyten dedifferenzieren. Hypomethylierung scheint also, vielleicht eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung für die Typ II Expression zu sein. Das Methylierungsmuster von $\alpha 2(I)$ ist in den untersuchten Zellarten, trotz unterschiedlicher Expression des Proteins, gleich (155,156). Die Promotorregion ist jedoch generell untermethyliert - eine Eigenschaft, die dieses Gen mit einigen Genen von "house-keeping" Proteinen teilt (157). Letzteres, sowie die Entdeckung, daß auch nichtexprimierende Zellen geringe Typ I-mRNA Mengen enthalten (s.unten), hat zur Hypothese geführt, daß die Transkription der Typ I Gene nie vollständig abgeschaltet wird (156,158).

Die Menge der Kollagen-mRNAs scheint jedoch nicht *allein*, die tatsächlich synthetisierte Proteinquantität zu bestimmen; andere Mechanismen, welche die Kollagenproduktion mitsteuern können, müssen in einigen Fällen angenommen werden: In Chondrozyten, die nachweislich kein Typ I Kollagen produzieren, sind die $\alpha 1(I)$ und $\alpha 2(I)$ mRNA in geringen Mengen vorhanden (1,117,120,158). Nach RSV-induzierter Dedifferenzierung ist die Typ I-mRNA Menge mit der Menge in Typ I Kollagen-exprimierenden Hautfibroblasten vergleichbar (152); trotzdem ist die in vivo Typ I Kollagen-expression nicht nachweisbar (119,120), bzw. minimal (121). Posttranskriptionelle Regulation kann auch die Synthese von Typ II bestimmen, zumindest bei der Dedifferenzierung mit Phorbol-Ester (117): Obwohl nach Induktion der Dedifferenzierung die Typ I und Typ II RNAs in gleichen Mengen koexistieren, wird nur Typ I translatiert; nach Redifferenzierung ist das Verhältnis von Typ II- zu Typ I-RNA wie 24 : 1, die zwei Typen werden jedoch in gleichen Mengen synthetisiert.

Mögliche Mechanismen der posttranskriptionellen Kontrolle auf mRNA-Ebene - die auch in anderen Kollagen-exprimierenden

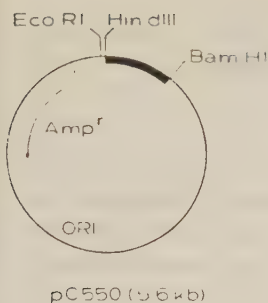
Zellen gezeigt wurde (61,62,127g,158) - sind vorgeschlagen worden: Experimentelle Evidenz gibt es z.B. für eine processing-Arretierung von Typ I Transkripten (117,127g,152, 158); zytoplasmatische *trans*-Regulation durch Proteinfaktoren (44a,120,159), bzw. regulatorische RNAs (158) wurde diskutiert. Eine auffällige Haarnadelstruktur mit möglicher Signalfunktion für solche Faktoren wurde in der 5'-nicht-translatierten Region der $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ und $\alpha 1(III)$ mRNAs identifiziert, die in der $\alpha 1(II)$ mRNA fehlt (160).

Trotz dieser Einsichten in regulatorische Mechanismen der Genexpression von charakteristischen Chondrozyten-Produkten ist es noch nicht möglich, die Veränderungen des Chondrozyten-Phänotyps auf molekularer Ebene zufriedenstellend zu beschreiben und zu verstehen. Für dieses Ziel ist erforderlich, weitere Komponenten, die am Prozeß der Dedifferenzierung beteiligt sind, zu erfassen und ihre genetische Regulation zu studieren. An dieser Stelle darf noch hervorgehoben werden, daß die Chondrozytendedifferenzierung nicht nur ein Modell zur Untersuchung des Knorpelphänotyps ist; sie stellt gleichermaßen ein geeignetes experimentelles System zur Erforschung von *allgemeinen* Regulationsmechanismen der Genexpression dar.

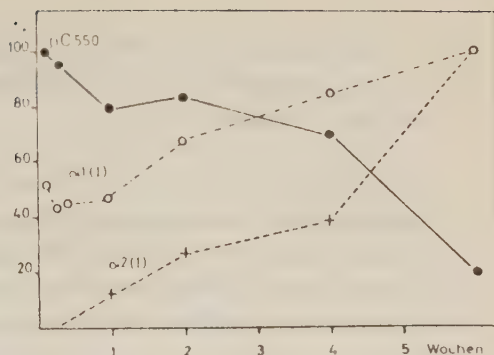
VORARBEITEN

In den Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde nach Chondrozyten-Proteinen gesucht, die für die Chondrogenese spezifisch, bzw. für die Aufrechterhaltung des Chondrozyten-Phänotyps notwendig sind. Um solche Protein-Komponenten zu erfassen, sind Chondrozyten-spezifische cDNA-Klone nach folgenden methodischen Schritten konstruiert worden (1): Chondrozyten aus embryonalen Huhn-Sterna (Hyalinknorpel) wurden durch limitierte Proteolyse dissoziiert und wenige

Tage in Kultur gehalten. Vor der Dedifferenzierung wurden die Zellen geerntet und ihre RNA isoliert. Die RNA wurde für PolyA(+) Spezies über Oligo-dT-Zellulose Chromatographie angereichert und nach Länge über einen Saccharosegradienten fraktioniert. Die Fraktionen mit RNAs über 4 kb wurden weiter verarbeitet. Die Längenselektion wurde wegen der ursprünglichen Absicht durchgeführt, RNA-Spezies für hochmolekulare Matrixkomponenten zu erfassen. Diese fraktionierte PolyA(+) RNA wurde nach Hybridisierung von Oligo-dT an die PolyA-Sequenz in cDNA revers transkribiert. Nach dem Muster der Konstruktion von pCOL1, einem Typ I Kollagen-spezifischen cDNA Klon (161), wurde die cDNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und im Gel analysiert. Einige prädominante Banden wurden herausgeschnitten und in pBR322 (162) kloniert. Der Nachweis, daß einige dieser Klone Abschriften von Chondrozyten-RNA enthalten, wurde dadurch erbracht, daß sie mit der angereicherten, radioaktiv markierten PolyA(+) RNA aus Chondrozyten hybridisierten. Die Spezifität der Expression der entsprechenden Gene in Chondrozyten wurde nun nicht durch das Ausbleiben der Hybridisierung mit RNA aus anderer Quelle ("differenzielle Hybridisierung"), sondern durch ihre Analyse während der Knorpelentwicklung bzw. Chondrozyten-Dedifferenzierung nachgewiesen. Am Beispiel eines solchen cDNA-Klons, der in dieser Arbeit weiter analysiert wurde, soll letzteres erläutert werden: Dieser Klon, im weiteren genannt pC550 (s.Abb.4A), wurde radioaktiv markiert und in Northern-blots zu Chondrozyten-RNA hybridisiert, die zu verschiedenen Stadien der in vitro Kultivierung isoliert worden war (s.Abb.4B). Es wurde gefunden, daß das Hybridisierungssignal mit zunehmender Dedifferenzierung abnimmt. Zur Kontrolle wurde, ebenfalls durch Northern-Blot-Analyse, die Zunahme der Typ I Kollagen-Expression, für die α_1 und α_2 Ketten, verfolgt, die charakteristisch für den Dedifferenzierungsvorgang ist.



A



B

Abb. 4A: Das Plasmid pC550. Der schwarze Bereich ist die cDNA-Insertion. ORI: Replikationsstartpunkt. Amp^r: Ampizillin-Resistenzgen. **B:** Veränderungen der relativen RNA-Menge von $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(II)$ und pC550 RNA in Chondrozyten während des Dedifferenzierungsprozesses. Der prozentualer Anteil der cDNA-Hybridisierung im Northern-Blot wird angezeigt (von(1)).

Dieser Test für C550 (sowie auch für einige andere cDNA-Klone) demonstriert die Assoziation der C550-Genexpression mit dem Chondrozyten-Phänotyp. Dies freilich beweist nicht eine strenge Expressionsspezifität in dem Sinne, daß sie *ausschließlich* in Chondrozyten stattfindet. Da jedoch das Ziel dieser Arbeiten eine Analyse von Elementen war, die den Chondrozyten-Phänotyp und seine Synthesekapazität insgesamt charakterisieren, wurde die Expressionsabnahme während der Dedifferenzierung als ausreichender Indikator für die aktive Beteiligung dieser Gene am Knorpelaufbau erachtet.

Folgende konkrete Möglichkeiten eröffnen sich also durch die Existenz der cDNA-Klone aus Chondrozyten:

- Durch diese Klone lassen sich Genprodukte identifizieren, die in Knorpelgewebe exprimiert werden;

einige davon, die instabil sind, oder in geringen Mengen vorkommen, würden sich dem *direkten* (proteinchemischen) Zugang entziehen.

- Mit Hilfe der cDNA-Klone kann die Genstruktur und die Expression dieser Komponenten analysiert werden. Dadurch lassen sich Regulationsmuster und -prinzipien erkennen, die eine Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit des Gewebes bedeuten.

AUFGABENSTELLUNG

Mengenmäßig vorherrschende und charakteristische Bestandteile des Knorpels, wie Kollagene, Proteoglykane und Hyaluronsäure sind in unterschiedlichem Ausmaß in ihrer Struktur und ihrem Metabolismus untersucht worden. Von Typ II Kollagen ist außerdem das Gen isoliert und die Struktur von regulatorischen DNA-Elementen erforscht worden (127c,140,149). Bei den anderen beschriebenen Knorpelkomponenten ist es aber noch nicht gelungen, bis zu dieser Stufe der Analyse vorzudringen, und wenig ist bekannt über charakteristische intrazelluläre Makromoleküle der Chondrozyten. Analytische und präparative Methoden der Gentechnologie erlauben, den Problemkreis der Gewebszusammensetzung und der Regulation von Gewebskonstituenten von der Ebene der Nukleinsäuren aus anzugehen. Dadurch sollte möglich sein, auch weitere, bis jetzt unbekannte, intra- bzw. extrazelluläre Komponenten zu erfassen, die bei der Ausübung der spezifischen Gewebsfunktion mitwirken müssen. Die Entdeckung solcher Komponenten, sowie die Aufklärung der Struktur und Regulation ihrer Gene, könnte helfen, die ursächlichen Zusammenhänge vieler Beobachtungen über die Entwicklung und Physiologie von Knorpel zu verstehen.

Für die Erfassung von Proteinkomponenten, die von Knorpelzellen synthetisiert werden, sind die in der Einleitung erwähnten Chondrozyten-assoziierten cDNA-Klone konstruiert worden. Beim Klon pC550 war die spezifische Hybridisierung mit RNA aus frisch isolierten Chondrozyten, sowie die Expressionsabnahme während der in vitro Dedifferenzierung am ausgeprägtesten. Dies ließ vermuten, daß das C550-Genprodukt eine spezielle Funktion in Chondrozyten als regulatorische oder strukturelle Einheit ausübt. Deshalb wurde dieser Klon zur näheren Charakterisierung gewählt. Im

einzelnen sollten folgende Aspekte mit Hilfe von pC550 bearbeitet werden:

- (1) Untersuchung der quantitativen Expression von C550 in vivo in einigen Geweben des Huhns und zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. Durch diese Daten sollte die Expressionsspezifität überprüft werden, die gegebenenfalls auch erste Hinweise auf die Identität und Funktion von C550 liefern könnte.
- (2) Konstruktion einer Genbank aus Calvaria; Identifizierung des C550-Gens und Charakterisierung seiner physikalischen Struktur.
- (3) Transkriptionsanalyse des Gens; es sollten die C550-Transkripte identifiziert, die kodogenen Regionen festgestellt und die Beziehung zwischen C550-DNA und Transkriptionsprodukten erläutert werden.
- (4) Identifizierung des Genproduktes. In diesem Zusammenhang sollte insbesondere versucht werden, den eukaryotischen C550-Anteil als chimäres Protein mit der β Galaktosidase zu exprimieren.

Diese Arbeit ist ein Beitrag zur molekularen Analyse einer Proteinkomponenten des Knorpels und deren Expression. Auf dieser Grundlage kann ihre biologische Funktion und Wechselwirkung mit anderen Makromolekülen erforscht werden.

RESULTATE

I. TEIL: REGULIERTE EXPRESSION VON C550

1. Kolinearität von C550 mit einem RNA-Bereich aus

Sterna und Feststellung der Transkriptionsrichtung

Um zu weiterreichenden Aussagen über die C550-Expression zu kommen, war es nötig festzustellen, ob das cDNA-Insert des pC550-Klons eine *genaue* Kopie einer (m)RNA in der RNA Population eines exprimierenden Gewebes ist (Huhn-Sterna). Im Lauf der RNA $\rightarrow$ cDNA Umschreibungsprozedur (136,166,168, 169), oder bedingt durch die bakterielle Propagation (163, 169), können nämlich zwischen cDNA und der entsprechenden RNA Unterschiede in einzelnen oder mehreren Basen entstehen bzw. auch größere DNA Rearrangements stattfinden.

Das Ausmaß der Kolinearität von C550 mit einer RNA wurde mit Hilfe der S1 Nuklease-Technik (164) bestimmt. Die Art des Vorgehens ist in Abb.5A skizziert (s.auch Materialien und Methoden). Entscheidend ist dabei, daß der Teil des radioaktiv markierten pC550 DNA-Strangs, der durch die komplementäre RNA geschützt wird, die Hydrolyse durch die S1 Nuklease überlebt. Im Falle einer perfekten Hybridisierung zwischen DNA und RNA auf Grund vollständiger Komplementarität ist der geschützte Strang genau so lang wie das C550-Insert; bei Abweichungen der Komplementarität werden kürzere Produkte erwartet (165,167).

Mit diesem Experiment läßt sich zusätzlich auch die Richtung der Transkription feststellen, dh. die Bewegungsrichtung der RNA-Polymerase in bezug auf die Restriktions-



Abb.5: Bestimmung der cDNA/RNA-Kolinearität und Transkriptionsrichtung. **A:** Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens. Der Kreis symbolisiert das Plasmid pC550 (s.Abb.4A), der schwarze Punkt das endständige ³²Phosphat. H: Hin dIII, B: Bam HI. Hier wurde angenommen, daß der "untere" DNA-Strang zur RNA homolog ist. **B:** Autoradiogramm der elektrophoretischen Analyse der S1 Nuklease-Spaltungsprodukten. B: Bam HI-, H: Hin dIII-, HB: Bam HI und Hin dIII-gespaltenes pC550-Plasmid (Referenz); alle Plasmide wurden an den 5'-Enden radioaktiv markiert; tRNA: aus E.coli, St: Huhn-Sterna Total-RNA; 1, 2: Stunden der Inkubationsdauer mit S1 Nuklease. Der Pfeil deutet das geschützte pC550-Insert an.

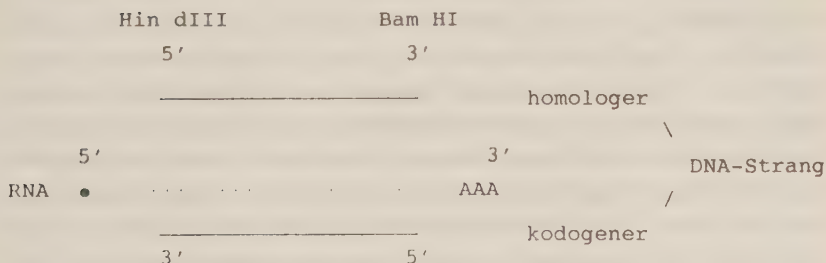
endonuklease-Stellen (Hin dIII und Bam HI, s.Abb.5A)

Das Ergebnis des Experimentes ist in Abb.5B dargestellt. Die Spaltung des mit Bam HI linearisierten pC550-Plasmids (gezeigt nach einer bzw. zwei Stunden) nach Hybridisierung

mit *Sterna*-Total-RNA führt zur Ausbildung einer radioaktiven Bande, die mit dem pC550-Insert (ca. 550 bp) komigriert. Im entsprechenden Bereich des mit *Hin* dIII linearisierten Plasmids ist keine Bande erkennbar. Die *spezifische* Wechselwirkung von C550 mit einer *Sterna* -RNA wird dadurch belegt, daß Hybridisierung des *Bam* HI-geschnittenen Plasmids mit tRNA aus *E.coli* das pC550-Insert nicht vor S1 Nuklease-Abbau schützen kann.

Zugabe von mehr Enzym zu den Ansätzen, bzw. S1 Nuklease-Spaltung bei höheren Temperaturen (bis zu 45° C) zur Sensitivitätssteigerung der Reaktion führt zu den gleichen Ergebnissen (nicht gezeigt). Nach diesem Ergebnis stand also fest:

- (1) Das *Hin* dIII-*Bam* HI Insert des Klons pC550 ist eine getreue Kopie eines Bereiches einer RNA aus Huhn-*Sterna*.
- (2) Die Richtung der Transkription ist von *Hin* dIII nach *Bam* HI. Damit sind der kodogene und der RNA-homologe DNA-Strang auch eindeutig definiert (s. später Relevanz bei der bakteriellen Expression, Teil IV):

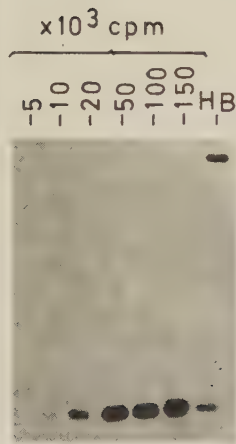


2. Absolute Anzahl der C550-RNA Transkripte in Sterna RNA

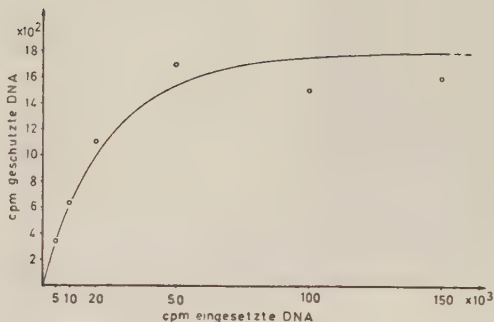
Einige knorpelspezifische Proteine werden in großen Mengen synthetisiert (Kollagen Typ II, core-Protein der Proteoglykane, s. Einleitung). Die diese Proteine kodierenden RNA-Moleküle müssen auch in relativ hoher Anzahl vorhanden sein. Um herauszufinden, ob die C550-RNA zu einer häufigen oder seltenen Proteinspezies gehört, sollte versucht werden, die Anzahl der zu C550 komplementären RNA-Moleküle (in einer bestimmten RNA-Population) zu ermitteln. Für diesen Zweck erschien wieder die S1 Nuklease-Technik als geeignet.

Die radioaktive Markierung der DNA-Enden in den S1 Nuklease-Experimenten (s. vorigen Abschnitt) erlaubt, die absolute Anzahl der Moleküle zu errechnen, indem man den radioaktiven Zerfall mißt. Wenn die DNA im Überschuß angeboten wird (Sättigungskonzentration, s. unten), entspricht die Anzahl der geschützten DNA-Moleküle der Anzahl der komplementären RNA-Moleküle.

Für die S1 Nuklease-Experimenten wurde pC550 mit Bam HI linearisiert, an den 5'-Enden radioaktiv markiert (vgl. Abschnitt 1.) und zur Ermittlung der Sättigungsmenge eingesetzt, d.h. derjenigen DNA-Menge, die erforderlich ist, um nach einer bestimmten Hybridisierungsdauer alle C550-komplementären RNA-Moleküle in einer RNA-Population abzufangen. Dazu wurden steigende Mengen radioaktiver DNA zu einer konstant gehaltenen Huhn-Sterna Total-RNA Menge (20 µg) gegeben und nach Hybridisierung und S1 Nuklease-Abbau die geschützten C550-Banden analysiert (s. Abb. 6A). Die Sättigung ist definiert durch das Erreichen eines Plateaus in der Intensität der radioaktiven Bandensignale. So wurde bestimmt, daß die Sättigung von 20 µg Total-RNA unter diesen



A



B

Abb.6: Hybridisierungssättigung von Sterna-RNA mit pC550-DNA. **A:** Elektrophoretische Auftrennung und Autoradiographie der S1 Nuklease-Spaltungsprodukte, nach Zugabe von steigenden Mengen Bam HI-linearisierter, 5'-endmarkierter pC550-DNA. HB: Referenz, s.Abb.5B. **B:** Graphische Darstellung der Meßwerte in Abb.6A.

experimentellen Bedingungen ab ca. 50×10^3 cpm C550-DNA erreicht wird (s.Abb.6B). Dieser Wert legt damit fest, ab welchem Verhältnis sich die DNA auf jeden Fall im Überschuß zu C550 befindet. Die gemessenen Radioaktivitätswerte im Sättigungsbereich können in die Anzahl der sich in den Banden befindenden Moleküle umgerechnet werden.

Für eine größere statistische Sicherheit wurden aber in einem ähnlichen Experiment mit der gleichen Technik auch weitere Werte erhalten: Bei konstant gehaltener DNA-Menge (immer im Überschuß) wurden die RNA-Mengen variiert

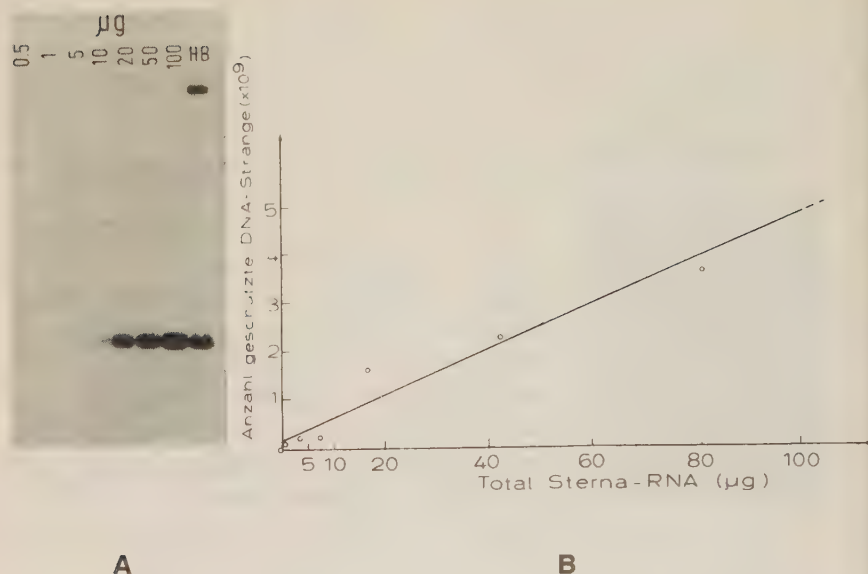


Abb7.: Bestimmung der Anzahl von pC550-komplementären Sequenzen in steigenden Mengen Sterna-Total-RNA. **A:** Autoradiogramm der elektrophoretischen Analyse der S1 Nuklease-Spaltungsprodukte bei konstanter pC550-DNA-Menge (Bam HI-linearisiert und 5'-endmarkiert), nach Zugabe von steigenden Mengen RNA; HB: Referenz, s.Abb.5B. **B:** Graphische Darstellung der Meßwerte in Abb.7A, nach Umrechnung in Molekülenanzahl (vgl.Materialien und Methoden).

(Abb.7A). Durch die erhaltenen Werte der radioaktiven Strahlung der Banden, ausgedrückt in cpm, wurde die absolute Anzahl der DNA-Stränge nach

$$10 \mu\text{Ci} = 22 \times 10^6 \text{ cpm} = 3.3 \text{ pmol Enden ssDNA}$$

berechnet. Lineare Regression der Werte (s.Methode 34.) ergibt einen Korrelationskoeffizienten k von 0.97 (Abb.7B). Die geschützte DNA ist also der eingesetzten RNA (0.5 - 100 µg) direkt proportional; damit kann die Menge der RNA-Moleküle vom ganzen Bereich der Kurve errechnet werden. Die Anzahl aller RNA-Moleküle der Sterna-RNA ist ca. 1 pmol/µg unter der Annahme einer mittleren Länge von

Total Sterna-RNA (μg)	C550-komplementärer Anteil (%)	Durchschnitt, Standardabweichung ($\bar{x}, \sigma$)
1	0.0250	
5	0.0105	
10	0.0055	
20	0.0160	0.0123 $\pm$ 0.0066 %
50	0.0090	
100	0.0075	

Tabelle 3: Prozentualer Anteil der pC550-komplementären RNA in verschiedenen Mengen Sterna-Total-RNA.

2.9 kb. Damit konnte das Verhältnis von C550-komplementärer RNA (=geschützte ssDNA) zur Gesamt-RNA für alle eingesetzten RNA-Mengen (s.oben) als prozentualer Anteil angegeben werden (s.Tabelle 3); er beträgt $0.0123 \pm 0.0066 \%$. Das heißt, daß sich unter rund 500 bis 1500 polyA(+) RNA-Molekülen mit 68 %iger Wahrscheinlichkeit ein Molekül C550-RNA befindet (wenn 10% der Total-RNA PolyA(+) RNA ist).

Diese Zahl bedeutet, daß die untersuchte RNA eine vergleichsweise seltene RNA-Spezies ist (vgl. Diskussion) und nicht für eines der in großen Mengen in Knorpel vorhandenen Proteine kodiert.

3. Expressionsspezifität von C550

Da C550 eine seltene RNA repräsentiert (s.vorigen Abschnitt), muß man davon ausgehen, daß das kodierte C550-Protein ebenfalls in geringer Menge vorkommt; es ist also schwierig, C550 mit einer der bestcharakterisierten Komponenten des Knorpels zu korrelieren (s.Einleitung). Die aus der C550-DNA-Sequenz hergeleitete Aminosäuresequenz zeigt mit anderen Peptiden keine Homologie (2). Die C550-Identität muß daher vorerst offen bleiben.

Als unmittelbare Folge dieses Ergebnisses entstand die Frage, inwieweit die Expression des entsprechenden, unbekannten Gens in situ spezifisch für ein Gewebe bzw. entwicklungsabhängig ist.

Diese Frage wurde ebenfalls mit Hilfe der S1 Nuklease-Technik angegangen. Zu diesem Zweck wurde Total-RNA aus verschiedenen Geweben von 12 Tagen alten Hühnerembryonen und aus Calvaria (Schädelknochen) und Sterna (Brustbeinen) auch zu weiteren Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung extrahiert. Der relative C550-Anteil in gleichen Mengen Total-RNA aus diesen Geweben wurde mit Hilfe der S1 Nuklease nach Hybridisierungssättigung mit endmarkierter C550-DNA (wie in Abschnitt 2 beschrieben) bestimmt (s. Histogramm in Abb.8). Wie man erkennt, unterscheidet sich die Netto-Synthese von Gewebe zu Gewebe (Vergleich der 12 Tagen-Werte): In Sterna, Calvaria und Röhrenknochen findet eine vergleichsweise stärkere Synthese als in anderen Bindegewebsarten wie Gelenkknorpel, und Huhn-Embryofibroblasten statt. Im Gegensatz dazu exprimieren Nicht-Bindegewebe, wie Leber und Hirn, das Gen in deutlich geringerem Ausmaß. Während der Embryonalentwicklung findet in Sterna über die Dauer von 8 Tagen (zwölfter bis neunzehnter Tag) keine wesentliche Ver-

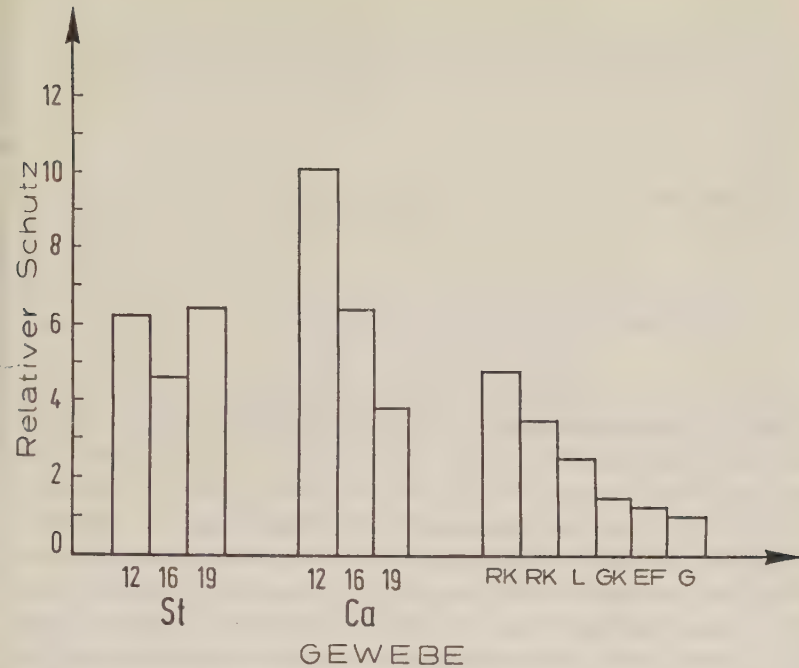


Abb.8: Histogramm der relativen Häufigkeit der C550-RNA in gleichen Mengen Total-RNA aus verschiedenen Geweben (vgl. Text für Details). St: Sterna, Ca: Calvaria, RK: Lange Röhrenknochen (zwei RNA-Präparationen), L: Leber, GK: Gelenkknorpel, EF: Huhn-Embryo-Fibroblasten, G: Gehirn; die Zahlen in der Abszisse über Sterna und Calvaria bedeuten Tage embryonaler Entwicklung.

Änderung der RNA-Menge statt. In Calvaria nimmt die RNA-Menge aber in der gleichen Periode kontinuierlich und signifikant ab; zu der oben demonstrierten Gewebespezifität kommt also noch eine entwicklungsabhängige Komponente hinzu.

Zusammenfassend läßt sich hier aussagen, daß der Grad der C550-Expression - gemessen an der RNA-Häufigkeit - spezifisch mit bestimmten Geweben assoziiert ist und, wie bei embryonalen Calvaria, vom Zeitpunkt der Entwicklung abhängen kann.

II. TEIL: DAS C550 GEN

4. Herstellung einer Genbank vom Huhn

4.1 Einführung

Für die Identifizierung und Analyse des C550-Gens sollte eine genomische Genbank vom Huhn konstruiert werden. In unserem Labor existierten zu der Zeit schon zwei Genbanken, die mit Huhn-DNA aus Sterna, bzw. dedifferenzierten Chondrozyten konstruiert worden waren (2). Aus folgenden Gründen wurde die Konstruktion einer neuen Genbank als sinnvoll erachtet: Bei der Konstruktion der vorhandenen Genbanken waren die 5'-terminalen Phosphatgruppen der eukaryotischen DNA bei der Ligation mit dem Vektor (vgl.unten) nicht entfernt worden; weiterhin waren diese Genbanken schon mehrere Male amplifiziert worden. So konnte man dadurch bedingte DNA-Artefakte und Aberrationen nicht ausschließen (vgl. dazu (187,201,202) und Referenzen dort). Für die neue Genbank wurde DNA aus dem am stärksten exprimierenden Gewebe, 12 Tage alten embryonalen Calvaria, benutzt, um sicher zu sein, daß die Primärstruktur des isolierten C550-Gens dem aktiven Status entspricht.

Eco RI-Spaltung von genomischer DNA (s.(2)) ergibt Fragmente, die von ihrer Länge her in den üblichen Phagenvektoren klonierbar sein würden. Deshalb war es zweckmäßig, zur Erfassung des C550-Gens, die genomische DNA für die Genbank-Erstellung mit Eco RI zu spalten.

Als Vektor wurde der lytische Phage λ Charon 4A gewählt (188). Die innere Region der λ Charon 4A-DNA kann durch

Fremd-DNA ersetzt werden (s.unten), deren Länge zwischen 8.2 und 22.2 kb variieren kann.

4.2 Experimentelles Vorgehen

Für die Genbank-Konstruktion wurde folgendermaßen verfahren:

Huhn-DNA wurde aus Calvaria (12 Tage embryonaler Entwicklung) isoliert. Wie in Abb.9A dargestellt, beträgt ihre Länge mehrere Hundert kb. Dies ist eine wichtige Voraussetzung dafür, daß die anschließend generierten Eco RI-Fragmente an *beiden* Enden die Eco RI kohäsiven Enden besitzen. Diese DNA wurde präparativ mit Eco RI partial gespalten und über einen Saccharose-Gradienten nach Länge aufgetrennt (Abb.9B). Die Fraktionen mit DNA der Länge 15-22 kb wurden vereinigt. Die 5'-endständigen Phosphatgruppen wurden mit BAP entfernt, um später artifizielle Vereinigung von von nicht zusammengehörenden Fragmenten zu vermeiden.

Der Vektor λ Charon 4A wurde präparativ mit Eco RI vollständig verdaut (Abb.10, Bahn E). Die "Arme" wurden ebenfalls über einen Saccharose-Gradienten angereichert (s.Methode 10.1); wie in Abb.10, Bahn A zu sehen ist, sind die Arme weitgehend frei von inneren Fragmenten.

Die Phagen-Arme und die fraktionierte eukaryotische DNA der Länge 15-22 kb wurden miteinander ligiert und in vitro zu infektiösen Virionen verpackt (s.Methode 12.3). Diese primäre Genbank enthielt insgesamt 4.5×10^6 pfu ($\text{ca. } 10^6$ pfu/ μg λ -Arme). Die in vitro verpackten Virionen wurden durch isopyknische Ultrazentrifugation im CsCl Gradienten gereinigt (s.Methode 12.5).

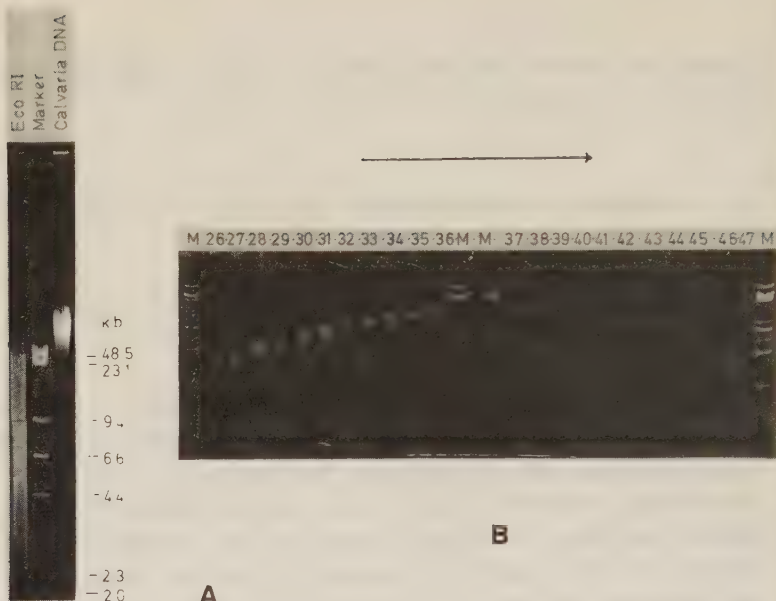


Abb.9A: Gelelektrophoretische Analyse der genomischen Huhn-DNA. Calvaria-DNA: Hochmolekulare, ungespaltene Huhn-DNA; Eco RI: vollständige Spaltung der Calvaria-DNA mit Eco RI; Marker: λ -DNA, ungespalten und gespalten mit Hin dIII. B: Gelelektrophoretische Analyse von Aliquoten der Saccharose-Gradient-Fractionen der Eco RI-partialspaltung von Calvaria-DNA. M: Marker-DNA, λ gespalten mit Hin dIII, λ Charon 4A ungespalten und gespalten mit Eco RI; die Zahlen geben die Nummer der Fractionen an; der Pfeil gibt die Richtung der Zentrifugalkraft an.

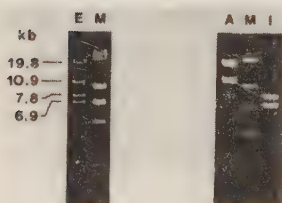


Abb.10, oben: Schematische Darstellung der λ Charon 4A DNA (188). Die "inneren" Fragmente, die nach Eco RI-Spaltung entstehen (Pfeile), sind angegeben. Unten: Gelelektrophoretische Analyse von λ Charon 4A (vgl. Text). E: Produkte der Eco RI-Spaltung (vgl. (189)); A: Angereicherte Arme; I: Abgereicherte "innere" Fragmente; M: (Marker) λ -DNA, gespalten mit Hin dIII.

4.3 Feststellung des Hintergrundes

Es war für die weiteren Experimente wichtig, den Hintergrund der Genbank zu bestimmen, dh., ob und wie viele Phagen auf Grund von Religation der "inneren" Fragmente keine eukaryotischen Sequenzen enthalten. Einen *qualitativen* Eindruck konnte man durch folgendes Experiment gewinnen: 10^5 Phagen der Genbank sind auf einer Agar-Platte bis zur Konfluenz der Plaques gewachsen, ihre DNA wurde isoliert und mit Eco RI gespalten. Das Ergebnis ist in Abb.11, Bahnen 3, 4, 5 gezeigt, wo man sehen kann, daß tatsächlich ein Teil der Phagen die inneren *lac5* und/oder *bio* Fragmente wieder erhalten haben.

Da diese inneren Fragmente von λ Charon 4A, *lac5* und *bio*, eine phänotypische Ausprägung haben (188,190), kann auch die *Anzahl* der Phagen erfaßt werden, die nicht, oder nicht nur eukaryotische Sequenzen enthalten.

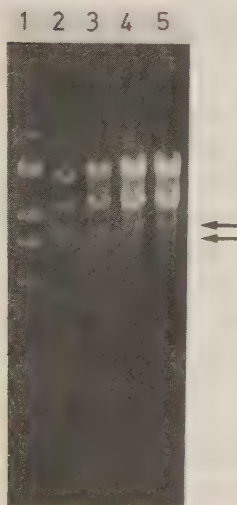
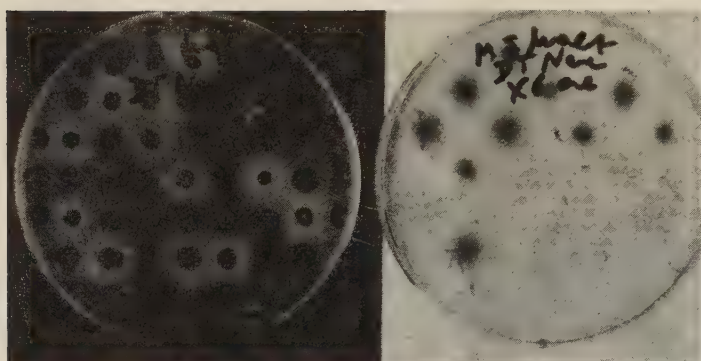


Abb.11: Gelelektrophoretische Analyse der Eco RI-Spaltungsprodukte von Calvaria-Genbankphagen (s.Text). 1: Marker, wie in Abb.10, unten; 2: λ Charon 4A, gespalten mit Eco RI; 3, 4, 5: Steigende Mengen der Genbank-Phagen-DNA, gespalten mit Eco RI; die Pfeile markieren die Banden der "inneren" Fragmente.



A

B

Abb.12: Plaques-Morphologie von selektierten Genbank-Phagen auf Biotin-freiem Minimal-Medium. A: Ohne X Gal. B: Mit X Gal.

Phänotyp	Genotyp
Dunkelblau + Wachstumsring:	$lac^+ bio^-$ (λ Charon 4A)
Dunkelblau - Wachstumsring:	$lac^+ bio^+$
Hellblau + Wachstumsring:	$lac^* bio^+$
Farblos + Wachstumsring:	$lac^- bio^+$
Farblos - Wachstumsring:	$lac^* bio^-$ oder
	$lac^- bio^-$ (reine Rekombinanten)

lac^* bedeutet: Religation des $lac5$ Fragmentes in der umgekehrten Orientierung, oder an anderer Stelle (vgl. Text).

Für den Nachweis des $lac5$ Fragmentes wurde eine repräsentative Anzahl von Phagen (ca. 10^3 pfu) auf Vollmedium-Platten mit X Gal als Indikator ausplattiert. Phagen mit $lac5$ in der *ursprünglichen* Position bildeten dunkelblaue Plaques (mit blauem Schein); alle Plaques, die das Eco RI geschnittene $lac5$ Fragment an *anderer Stelle* oder in der *umgekehrten* Orientierung wiedereingebaut haben, erzeugen wegen Derepression des bakteriellen lac Operons hellblaue Plaques (ohne Schein).

Der Wiedereinbau des bio Fragmentes wurde auf biotinfreiem Minimalmedium verfolgt (Abb.12A): Auf diesem

Medium zeigt der Wirt DP50supF (*bio*⁻) nur noch ein geringes Restwachstum; Abwesenheit des *bio* Fragmentes von den Phagen läßt gerade noch sichtbare Plaques erscheinen. Hingegen beinhalten Plaques, um die ein deutlicher bakterieller Wachstumsring erscheint, Phagen mit dem *bio* Fragment. Einschluß von X Gal ins biotinfreie Minimalmedium läßt 5 der 6 möglichen Genotypen der Genbank-Phagen phänotypisch gleichzeitig unterscheiden (Abb.12B).

Mit den beschriebenen genetischen Tests konnte gezeigt werden, daß der Hintergrund der Genbank weniger als 10% beträgt. Der Rest der Genbank enthält Phagen, die ausschließlich eukaryotische DNA tragen, das sind in etwa 4×10^6 pfu. Unter der Annahme, daß eine diploide Huhnzelle 2.5 pg = 2.5×10^6 kb DNA enthält (173) und daß jeder rekombinante Phage im Durchschnitt 18.5 kb eukaryotische DNA trägt, repräsentiert die Genbank (mit 4×10^6 rekombinanten Phagen) ca. 55 haploide Genomäquivalente.

5. Screening der primären Genbank für C550-homologe Sequenzen und Amplifikation der Genbank

Die Wahrscheinlichkeit P, mit der ein zu C550 homologer genomischer Klon sich unter einer Stichprobe N von rekombinanten Klonen befindet, hängt vom Umfang dieser Stichprobe ab. Dies ist durch

$$P = 1 - (1 - f)^N$$

bzw.

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

quantitativ wiedergegeben, wobei f das Verhältnis von durchschnittlicher Fragmentlänge zur Länge des gesamten (haploiden) Genoms ist (200). f ist hier $18.5 \text{ kb} / 1.25 \times 10^6 \text{ kb} = 1.48 \times 10^{-5}$. Danach kann man die Anzahl N der rekombinanten Phagen errechnen, die nötig ist, um mit der Wahrscheinlichkeit P *mindestens* einen Phagen darunter zu haben, der zu C550 komplementär ist:

für $P = 0.90$ ist $N = 1.6 \times 10^5$

für $P = 0.95$ ist $N = 2.0 \times 10^5$

für $P = 0.99$ ist $N = 3.1 \times 10^5$

Um des Erfolges sicher zu sein, und dem vorhandenen Hintergrund Rechnung zu tragen, wurde also entschieden, ca. 4×10^5 Phagen der Genbank (entsprechend 5.5 haploide Genom-äquivalente) nach C550-homologen Klonen zu durchsuchen. Die Suche wurde jedoch nicht direkt über Hybridisierung mit dem pC550-Insert durchgeführt, da schon aus der Sterna-Genbank (vgl. Abschnitt 4.1) einige Klone isoliert und partial charakterisiert worden waren (2); für das "screening" der hier beschriebenen Calvaria-Genbank wurde also ein Promotor-proximales Fragment aus diesen Klonen benutzt (genannt "St608", s.(2)). Somit wurde die Suche nach genomischen Klonen in der Calvaria-Genbank mit der Bemühung um eine Ausweitung des erfaßten genomischen Bereichs in 5' Richtung gekoppelt. Die genaue Ausführung der in situ Hybridisierung von Plaques und deren vollständige Reinigung ist in Methode 12.6 beschrieben.

Unter 4×10^5 pfu wurden 13 positive, sog. ACA608 Klone (mit Lac⁻Bio⁻ Phänotyp) identifiziert, zu denen auch pC550 hybridisierte. Für diese starke Abweichung von der Statistik bieten sich zwei formale Erklärungen an: Nicht alle Teile

des Huhn-Genoms sind klonierbar (vgl. dazu (201,202) und Referenzen dort); folglich sind die klonierbaren in einer bestimmten Stichprobe *überrepräsentiert* im Vergleich zum errechneten Wert. Alternativ oder zusätzlich: der gesuchte Locus kommt selbst *mehr als nur einmal* im haploiden Genom vor. Diese Möglichkeit wird in der Diskussion näher erläutert.

Nach der sicheren Identifizierung der Klone wurde die Genbank, wie in Methode 12.5 beschrieben, amplifiziert (um einen Faktor von 3×10^5) und in dieser Form aufbewahrt.

6. Charakterisierung der λ CA608-Klone

6.1 Länge der eukaryotischen DNA

Die DNA der λ CA608 Klone wurde durch Mini-Lyse isoliert (s.Methode 8.4) und ihre physikalische Struktur analysiert. Als erstes wurde der Gehalt an eukaryotischen Sequenzen durch Eco RI-Spaltungen bestimmt. Alle Klone enthalten zwei lange Eco RI-Fragmente mit 8.3 und 5.8 kb Länge (s.Abb.13A). Die Identifizierung von kürzeren Fragmenten, die durch Ethidiumbromid-Färbung nicht sichtbar sind, wurde auf folgende Weise vorgenommen: Aliquote der Eco RI-gespaltenen Klonen-DNA wurden an den 3'-Enden in vitro mit Klenow-Polymerase radioaktiv markiert (s.Methode 13.3); damit erhält jedes Fragment ungeachtet der Länge ein gleich starkes Signal. Die Analyse in einem höherprozentigen Agarose-Gel (s.Abb.13B) ergab nach radioaktiver Exposition, daß bei 7 der 13 Klone (Nr. 1, 3, 4, 8, 11, 12, 13) ein 0.75 kb langes Fragment zusätzlich existiert; weitere, noch kleinere Fragmente wurden nicht gefunden. Somit ist der Gehalt der

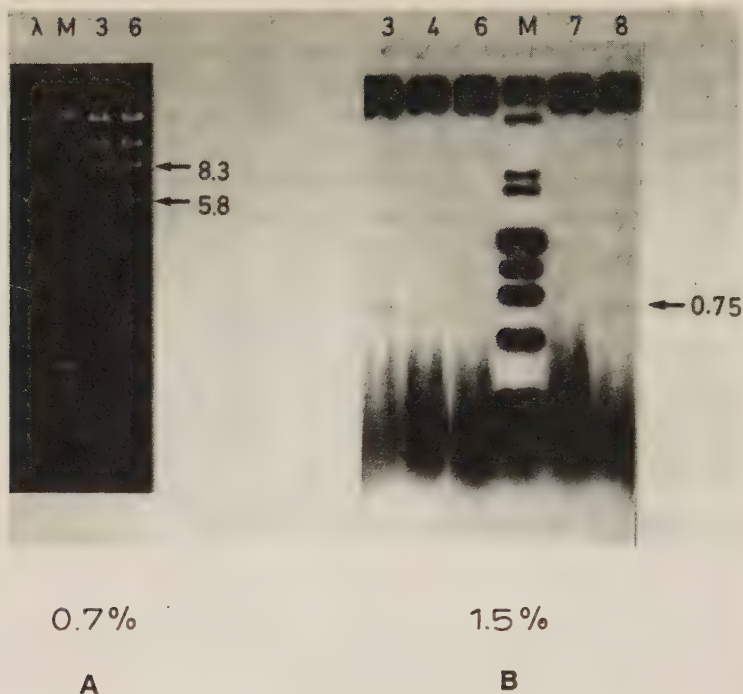


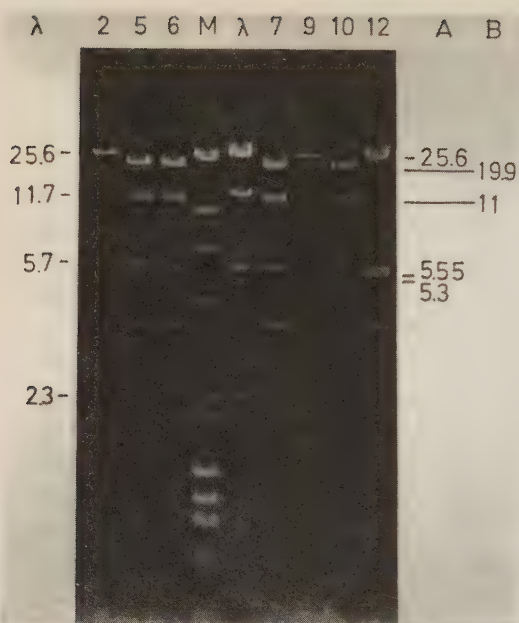
Abb.13: Gelelektrophoretische Analyse der Eco RI-Spaltungsprodukte von λ Phagen. λ : λ Charon 4A; 3, 4, 6, 7, 8: Nummer der Klonen aus der Calvaria-Genbank; M: DNA-Marker, λ geschnitten mit Hin dIII und ϕ X geschnitten mit Hae III; die Markerbanden sind am 3'-Ende radioaktiv markiert; die Pfeile geben die Länge der eukaryotischen DNA in kb an; 0.7 % und 1.5 %: Agarosegelkonzentration. A: Ethidiumbromidfärbung; B: Autoradiogramm des Agarosegels.

Klone an eukaryotischer DNA 14.1 bzw. 14.85 kb, ergebend 99.4-101% λ Charon 4A- (45.4 kb) bzw. 93-94.5% λ -Wildtyp- (48.5 kb) Virion-DNA-Länge (189,203). Das Vorhandensein der multiplen Eco RI-Stellen innerhalb der klonierten DNA beweist außerdem, daß die Eco RI-Spaltung der Calvaria-DNA zur Genbank-Konstruktion in der Tat partial war (vgl. Abschnitt 4.2).

6.2 Orientierung der eukaryotischen DNA

Die Orientierung der Klone wurde durch Spaltung mit *Hin* dIII untersucht. Sieben Klone werden in Abb.14 exemplarisch gezeigt. *Hin* dIII spaltet im rechten Arm von λ Charon 4A einmal (189), was zum 5.7 kb Fragment (rein prokaryotischen Ursprungs) führt; dies ist allen Klonen gemeinsam. Die vier sichtbaren Fragmente ab 4.1 kb abwärts sind auch allen Klonen gemeinsam; sie sind "innere" Fragmente der eukaryotischen DNA und geben über die Orientierung der eukaryotischen Insertion keine Auskunft. Anhand der übrigen Fragmente lassen sich drei Gruppen unterscheiden: Klon Nr. 2 und 9 (25.6 und 5.3 kb), Klon Nr. 12 (25.6 und 5.55 kb) und Klone Nr. 5, 6, 7 und 10 (19.9 und 11 kb). Diese Fragmente repräsentieren "Hybrid"-DNA, bestehend zum Teil aus λ -Armen, zum Teil aus Huhn-Sequenzen. Die Orientierung der Klone ergibt sich durch den Vergleich der "Hybrid"-Fragmente mit den zwei längsten Vektor-Fragmenten (25.6 und 11.7 kb), die die *Eco* RI-Junktionsstellen enthalten. Bei der ersten Gruppe (Klon Nr. 2 und 9) kann das kleinere (5.3 kb) nur durch die Verkürzung des 11.7 kb langen Vektor-Fragmentes entstanden sein, auf Grund von einer *Hin* dIII-Stelle in der eukaryotischen DNA, ganz dicht an der *Eco* RI-Stelle des rechten λ -Arms (s. Abb.14 und Schema). Das impliziert, daß das 25.6 kb Fragment der 1. Gruppe den linken λ -Arm (19.9 kb) enthält und nach rechts von einer *Hin* dIII-Stelle begrenzt wird, die (25.6 - 19.9 =) 5.7 kb von der *Eco* RI-Junktion entfernt ist. Das ergibt die

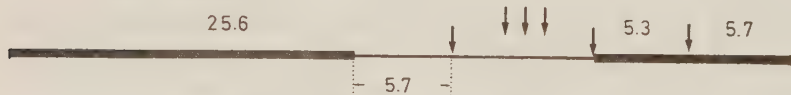
Abb.14, oben: Gelelektrophoretische Analyse der *Hin* dIII Spaltungsprodukte von Calvaria-Klonen. 2, 5, 6, 7, 9, 10, 12: Klonnummern; M: Marker, wie in Abb.13; λ : λ Charon 4A, geschnitten mit *Hin* dIII; in der linken Spalte werden die Bandenlängen von λ Charon 4A, in der rechten Spalte die charakteristischen Fragmentlängen der Klone mit der Orientierung A, bzw. B in kb angegeben. Unten: Kartierung der *Hin* dIII-Spaltstellen auf den Calvaria-Klonen (vgl. Text). Dicke Balken: Phagen-Arme; dünne Linien: Insert-DNA; über der DNA werden die *Hin* dIII-Fragmentlängen, unter der DNA andere Abstände angegeben.



λ Charon 4A



Orientierung A



Orientierung A (Klon Nr.12)



Orientierung B



Anordnung, die in Abb.14 willkürlich "Orientierung A" bezeichnet wird.

Die umgekehrte Orientierung kann davon abgeleitet werden (s.Schema in Abb.14); die erwarteten Fragmente, die von der ersten Klongruppe verschieden sind, müssen dann 19.9 und 11 kb lang sein, und genau das wird bei den Klonen 5, 6, 7 und 10 gefunden: Diese enthalten also die eukaryotische DNA in der "Orientierung B".

Klon Nr. 12 enthält als einziger von den untersuchten das 0.75 kb Eco RI-Fragment (s.oben). Durch gleiche Überlegungen wie für die 1. Gruppe (Klone 2 und 9) wurde hergeleitet, daß sich hier die eukaryotische Insertion in der Orientierung A befindet. Durch die Hin dIII-Spaltung wird das 11.7 kb Vektor-Fragment aber nicht zu 5.3, sondern zu 5.55 kb verkürzt, was bedeutet, daß das 0.75 kb Eco RI-Fragment dem rechten Vektorarm direkt benachbart ist; da andererseits $5.3 + 0.75 = 6.05$ und nicht 5.55 kb ergibt, muß mindestens eine zusätzliche Hin dIII-Stelle innerhalb des 0.75 kb Fragmentes gefordert werden, ca. 0.25 kb von der Eco RI-Junktionsstelle entfernt, sodaß $5.3 + 0.25 = 5.55$ kb. Somit ergibt sich für Klon Nr.12 die in Abb.14 gezeigte Restriktionskarte für Hin dIII.

6.3 Physikalische Charakterisierung des genomischen Bereichs durch Restriktionsendonukleasen

Vor weiterer Charakterisierung der Calvaria-Klone wurde ein Vergleich mit der Struktur der Klone aus Sterna vorangestellt (2). Schon die Anzahl und Größe der Eco RI-Fragmente waren die gleichen, wie die von den genomischen Klonen aus Sterna. Die Übereinstimmung des Restriktionsmusters auch mit der Hin dIII-Endonuklease läßt zu, die in (2) ermittelte Reihenfolge der Eco RI-Fragmente auch für die Calvaria-Klone

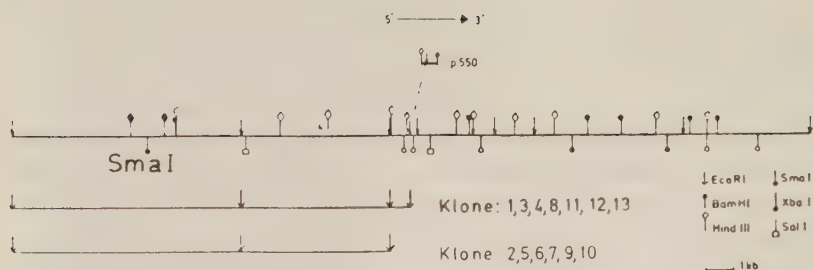
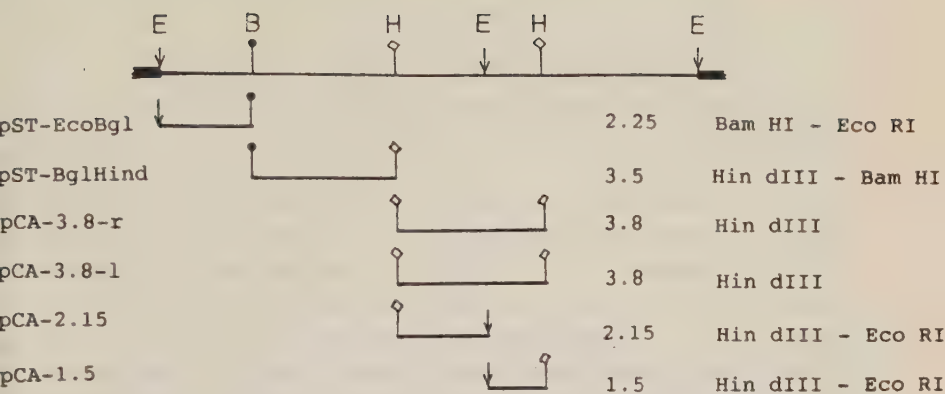


Abb.15: Der genomische C550-Bereich (von (2)). Die Schnittstellen einiger Endonukleasen sind eingezeichnet; über der Restriktionskarte ist die Lage des cDNA-Inserts C550, sowie die Transkriptionsrichtung angezeigt; unter der Restriktionskarte ist der Bereich angegeben, der von den Calvaria-Klonen abgedeckt wird; die Zahlen bedeuten die jeweilige Klonnummer.

zu übernehmen. Für alle weiteren Experimente wurde die durch die weit umfassendere Restriktionsanalyse der Sterna- Klonen erarbeitete Genom-Struktur als richtig vorausgesetzt. Dies wurde später auch durch Sequenzstudien und Subklonierungen bestätigt (s.folgende Kapitel).

Die Zuordnung der λ CA608-Klone zu dem schon erfaßten Genombereich ist in Abb.15 gezeigt. Es war nicht möglich, Klone mit Bereichen links von der Eco RI-Begrenzung zu identifizieren. Auf Grund der Restriktionkarte kann nicht auf ein bisher bekanntes Huhn geschlossen werden. Die Verteilung der Schnittstellen von jeder einzelnen Restriktionsendonuklease (mehr oder weniger zufällig) macht eine Gen-interne Sequenzrepetition unwahrscheinlich. Soweit analysiert, ist im Restriktionmuster weder der aus Calvaria noch aus Sterna isolierten Klonen Polymorphismus beobachtet worden.



Subklon-Name	Lage im Genom	Insert-Länge (kb)	Stellen in pUC9

Abb.16: Konstruierte Subklone des C550-genomischen Bereichs. Oben wird der eukaryotische Bereich des Calvarien-Klons Nr.9 angezeigt. E: Eco RI, B: Bgl II, H: Hin dIII (vgl.Methode 12.7 für Konstruktionsdetails).

6.4 Subklonierungen in Plasmiden

Für die Feinanalyse des Gens und seine Expression wurden für eine leichtere Handhabung genomische Teile von den rekombinanten Phagen in pUC9 (204) subkloniert (s.Methode 12.7). Diese Subklone, sowie ihre Orientierung im Vektor sind in Abb.16 angegeben. Die Identifikation der Insertion erfolgte durch molekulare Hybridisierung und/oder Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide. Von weiteren Genombereichen waren Subklone von den Sterna-Klonen vorhanden.

6.5 Sequenzierung genomischer Bereiche

Zur Charakterisierung der Primärstruktur wurde die klonierte DNA teilweise sequenziert. Insbesondere erschien die linke Region des erfaßten genomischen Bereichs interessant, die sich in der Nähe des vermuteten Promotors liegen dürfte (2). Auszugsweise wird hier die Sequenz um die markierte Sma I-Stelle in Abb.15 wiedergegeben, die eine sehr auffallende Basenzusammensetzung aufweist (Die Sma I-Stelle ist dick geschrieben; an Stellen, wo zwei Nukleotide nicht unterschieden werden konnten, sind beide angegeben; unidentifizierte Nukleotide sind mit X bezeichnet):

```

                                     5' - GTGTCCCG
GCGGCCTCCG AGCGCGGCGA GAGGGTCCTC GCGAGGGCCA AGAGGTCGCT
CCGCCCGCTC GCCGGCCGCC CGGCCTCGGC GCCGCGGCGC CCGCCCGCCC
GCCGCTCCCC TCGCCTCGCC CCGCTCCCCC CGAGCGCTGG GCCCCGGGGGA
AGTCCGGCG GCGGCGGAGA CGAGCGGGGC GAGGAACGCG CGGGGGGCGC
CGGGGAGGAG AGGAGAGGAG GAGAACGGAG CGGAGCGGAG GGGCCCCGCG
GAACGGCGCT CGGAGCGGXC GCGGACCCCC CGCXGGGTGA CAGCGGCCCCG
GTCXGGCGCG G - 3'

```

Die Strategie der Sequenzierung ist Methode 15.1 zu entnehmen. Der GC-Gehalt in dieser Region ist überdurchschnittlich hoch (ca. 80%), was eine außergewöhnlich kompakte DNA-Struktur in vivo reflektiert. Über die physiologische Bedeutung, wie z.B. über mögliche Sekundärstrukturen mit regulatorischer Funktion, kann im Augenblick nur spekuliert werden. Der extreme Charakter dieser Region bezüglich des GC-Gehaltes wurde später durch umfassende Sequenzierungsstudien bestätigt und erweitert. Diese Arbeiten sind in (2) in vollem Ausmaß dargestellt und interpretiert.

7. Untersuchung von Telomerstrukturen

7.1 Problemstellung

Ein möglicher Grund der scheinbaren Abwesenheit einer Eco RI-Stelle, links vom erfaßten Bereich (vgl. Abschnitt 6.3), könnte die Lokalisation des untersuchten Gens in der Nähe eines Telomers sein; d.h., die DNA selbst ist abwesend, oder nicht in Bakterien klonierbar (vgl. dazu (205)). Telomere niederer Organismen sind untersucht worden; sie weisen eine besondere Primärstruktur der DNA auf (s. in (206,207) und in den Referenzen dort). Der besondere strukturelle Charakter des C550-Gens in dieser Region wurde schon durch die Sequenzstudien unterstrichen (diese Arbeit und (2)). Da das Telomer primär eine zytologisch definierte Struktur ist, ist die adäquateste Methode, ein solches zu identifizieren, die in situ Hybridisierung von Metaphase-Chromosomen; da das Huhn jedoch eine sehr große Anzahl von fast punktförmigen Mini-Chromosomen besitzt (Abb.17), ist die Zuordnung von Genen zu den Chromosomen-Enden unsicher. Deshalb wurde eine andere Methode, die die Anwendung der Nuklease Bal 31 einschließt, für diese Fragestellung gewählt (in Anlehnung an (208)).



Abb.17: Metaphasechromosomen des Huhns (Aufnahme von J.Mollenhauer).

Diese Methode macht die Eigenschaft von Bal 31 zunutze, Doppelstrang-DNA von den Enden her exonukleolytisch sukzessiv abzubauen (209). Nach Restriktionsspaltung der so behandelten DNA werden also verkürzt und verschwinden zuerst diejenigen Fragmente, die am nächsten zu einem Ende liegen. Von einigen Telomeren wird angenommen, daß die zwei DNA-Stränge über ein "loop" verbunden sind (212). Solche Telomere sind offensichtlich ebenfalls Substrate für Bal 31, welche die im loop vorhandene *Einzelstrang-DNA* zuerst endonukleolytisch hydrolysiert (209). Wenn das C550-Gen in der angenommenen Orientierung in der Nähe eines Telomers liegt, sollten also nach Bal 31- und Restriktionsspaltung der genomischen DNA, die Fragmente in der Reihenfolge verschwinden, die ihrer Entfernung vom DNA-Ende entspricht - im Falle von Eco RI z.B., zuerst das 8.3 kb (dem Telomer am nächsten), dann das 5.8 kb Fragment usw. (vgl. Abb. 15). Im gegenteiligen Fall sollten die Fragmente, je nach Dauer des Bal 31-Abbaus, entweder unverändert bleiben, oder *gleichzeitig* verschwinden. In jedem Fall erfolgt die Identifizierung der Fragmente im Gemisch der Gesamt-DNA durch Hybridisierung mit entsprechenden radioaktiven Subklon-Proben.

7.2 Vorexperiment

Um über die charakteristischen Parameter des Enzyms Bal 31, sowie konkret über die Eignung der Methode einen Eindruck zu bekommen, wurde ein Vorexperiment mit voraussagbarem Ausgang durchgeführt. Als lineare DNA wurde die von λ Charon 4A gewählt, worauf die Anordnung der Eco RI-Stellen und -Fragmente bekannt ist (s. Abb. 18). Die "innere" Region (Fragmente 7.9 und 6.9 kb) liegt näher zur "rechten" *cos* Stelle (DNA-Ende), die hier das Telomer darstellen soll. Nach genügend langer Bal 31-Behandlung müssen also die inneren Eco RI-Fragmente abgebaut werden, und zwar zuerst das 7.9 kb (am nächsten zur rechten *cos* Stelle) und dann das 6.9 kb Fragment.

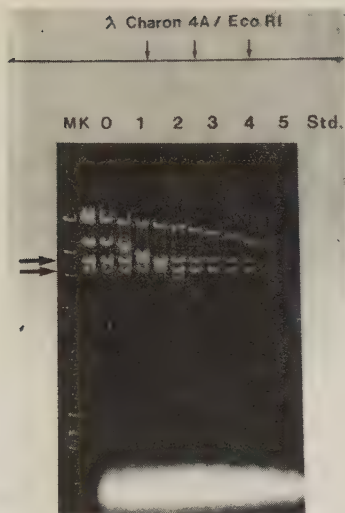


Abb.18: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte von λ Charon 4A nach Spaltung mit Bal 31 und Eco RI. M: Marker, wie in Abb.14; K: Kontrolle, λ Charon 4A, gespalten nur mit Eco RI; die Pfeile bezeichnen die "inneren" Phagenfragmente (vgl.Text).

Bei der Durchführung des Experimentes wurden zu bestimmten Zeiten dem Bal 31-Ansatz Aliquote entnommen, diese Reaktion gestoppt, und die DNA mit Eco RI gespalten (s.Methode 16.1). Das Ergebnis ist in Abb.18 gezeigt: Zuerst werden die λ -Arme von Bal 31 vom Ende her angegriffen und abgebaut. Erst nach vollständigem Abbau des rechten Arms (10.9 kb) erreicht die Nuklease die innere Region, wo sie, wie erwartet, zuerst das 7.9 kb Fragment abbaut. (Hier wurde die Analyse abgebrochen, bevor die Nuklease auch das 6.9 kb Fragment erreicht hatte.) Von der meßbaren Verkürzung der Fragmente bekannter Länge und Masse pro Zeiteinheit wurde die Abbaugeschwindigkeit von Bal 31 berechnet; sie beträgt im Durchschnitt 2.2 kb dsDNA pro Stunde und pro DNA-Ende. Wichtig ist, daß das Verhältnis von Enzymmolekülen zu den vorhandenen DNA-Enden größer 1 ist, um einen möglichst gleichmäßigen Abbau zu gewährleisten; im demonstrierten Experiment scheint das der Fall gewesen zu sein.

7.3 Zielexperiment

Nachdem über die Eignung der Methode Sicherheit erzielt wurde, wurde das Hauptexperiment mit genomischer DNA angesetzt. Da die Länge der isolierten Calvaria-DNA mehrere Hundert kb beträgt (vgl. Abschnitt 4.2), besteht für sie eine große Wahrscheinlichkeit, daß die Zahl der isolierungsbedingten Doppelstrangbrüche (die Telomerstrukturen vor-täuschen) gering ist.

Die Calvaria-DNA wurde für die Dauer von 10 Stunden mit Bal 31 verdaut, wobei das beim Vorexperiment günstig erwiesene Verhältnis von Enzym zu DNA-Enden beibehalten wurde (vgl. Methode 16.2). Der Reaktion wurden stündlich Aliquote entnommen, die Bal 31 gestoppt, die Ionenstärke berichtigt und die Bal 31-Produkte mit Eco RI gespalten. Die Aliquote wurden über ein Agarose-Gel elektrophoretisch nach Länge getrennt (vgl. Abb.19A), auf Nitrozellulose transferiert (nach Southern) und mit den nicktranslatierten Inserts der Subklone pST-BglHind und pST-5/5.3 (2) hybridisiert (vgl. Methode 24.). Das Ergebnis der Exposition ist in Abb.19B gezeigt: Die genomischen Eco RI-Fragmente (8.3 und 5.8 kb), die dem klonierten Bereich entsprechen, bleiben über die ganze Periode des Bal 31-Verdaus unverändert; vorausgesetzt, daß die Geschwindigkeit von Bal 31 hier der oben errechneten entspricht, bedeutet dies, daß die klonierte Region sich mindestens etwa 22 kb entfernt von einem physiologischen DNA-Ende befindet, also weit ab von einem Telomer. Somit entfällt diese Möglichkeit als Grund für die Nicht-Klonierbarkeit des Bereichs weiter links von der Eco RI-Stelle.

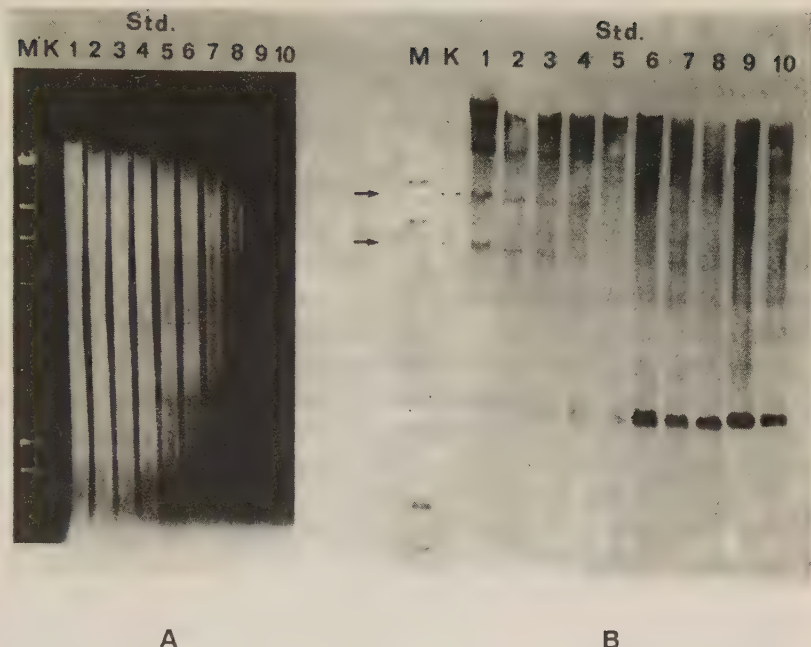


Abb.19: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte von genomischer Huhn-DNA nach Spaltung mit Bal 31 und Eco RI. M: Marker, wie in Abb.18; K: Kontrolle, Calvaria-Klon Nr.9, gespalten mit Eco RI und radioaktiv markiert an den 3'-Enden; 1 - 10: Stunden der Bal 31-Inkubation. **A:** Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels. **B:** Southern-Blot; Hybridisierung mit 5'-spezifischen genomischen Klonen (vgl.Text). Die Pfeile bezeichnen die Eco RI-Fragmente im Klon Nr.9 bzw. in der genomischen DNA; Das Hybridisierungssignal bei 2.3 kb (und die restlichen Hintergrundbanden) entsteht aus einer eingeschlossener DNA zur Kontrolle der Vollständigkeit der Eco RI-Spaltung (s.Methode 16.2)

III. TEIL: TRANSKRIPTION DES C550-GENS

8. Länge und Anzahl der C550 Transkripte

Zur Bestimmung der C550-Transkriptlänge wurde ein Northern-Blot (215) durchgeführt: Total-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose (Gene Screen) übertragen und mit nick-translatierter C550-DNA hybridisiert (s.Abb.20, Bahn T). Die Hybridisierung ergab zwei Banden mit 6.5 und 4.4 kb. Diese Banden sind RNase-sensitiv und lassen sich über oligo-dT-Zellulose anreichern (Abb.20). Somit führt Transkription des C550-Gens zu zwei PolyA(+) RNAs.

T D W E r

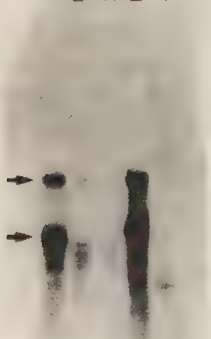


Abb.20: Northern-Blot von Huhn-Sterna-RNA; Hybridisierung mit nicktranslatierter pC550-DNA. T: Total-RNA; D: Nichtgebundene RNA an Oligo-dT-Zellulose; W: RNA im Waschpuffer der Oligo-dT-Säule; E: Eluierte RNA von der Oligo-dT-Säule; r: wie T, nach RNase-Abbau. Die Pfeile bezeichnen die 6.5 und 4.4 kb RNA-Banden (vgl.Text). Die kurze Bande in r ist eine in den RNase-Ansatz zur Kontrolle eingeschlossene, radioaktiv markierte DNA.

Dieses Ergebnis erlaubt in Kombination mit den Daten von den S1 Nuklease Experimenten den Schluß, daß die C550-DNA zu *beiden* RNAs im gleichen Ausmaß komplementär ist. Es mußte jedoch noch ausgeschlossen werden, daß die *eine* RNA mit einem *kürzeren* C550-Bereich hybridisiert, der auf Grund der 5'-End markierung bei den S1 Nuklease Initialexperimenten nicht erfaßt werden konnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die S1 Nuklease Experimente an dieser Stelle wiederholt, indem pC550 nach Hin dIII-Linearisierung (vgl. Abb.5A) entweder am 3'-Terminus, bzw. intern über die ganze Länge (durch ^{32}P -Einbau in vivo, s.Methode 14.) markiert wurde. In jedem Fall konnte nur die 550 Nukleotide lange DNA-Bande und keine kürzeren nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigt den angenommenen Sachverhalt, daß das pC550-Insert zu beiden RNAs im gleichen Ausmaß komplementär ist, was gleichbedeutend damit ist, daß die zwei RNAs untereinander in diesem Bereich homolog sind.

Diese Schlußfolgerung läßt eine semiquantitative Auswertung der Northern-Hybridisierung zu: da C550 gleiche Längenteile der zwei RNAs abdeckt und die Intensität der Hybridisierungssignale ähnlich stark ist, müssen die zwei RNA-Spezies in vergleichbarer Anzahl vorhanden sein.

9. Kodogene Bereiche der genomischen Region und Mindestlänge des Gens

Die Frage, von welchem Teil der klonierten genomischen Region die C550-komplementären RNAs transkribiert werden, wurde auch durch Northern-Blot-Analyse untersucht: Sieben genomische, nichtüberlappende Subklone wurden durch Nick-Translation radioaktiv markiert und jeder von ihnen zu Total-RNA von Calvaria bzw. Sterna (jeweils 12 Tage alte Embryonen) hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abb.21 zu

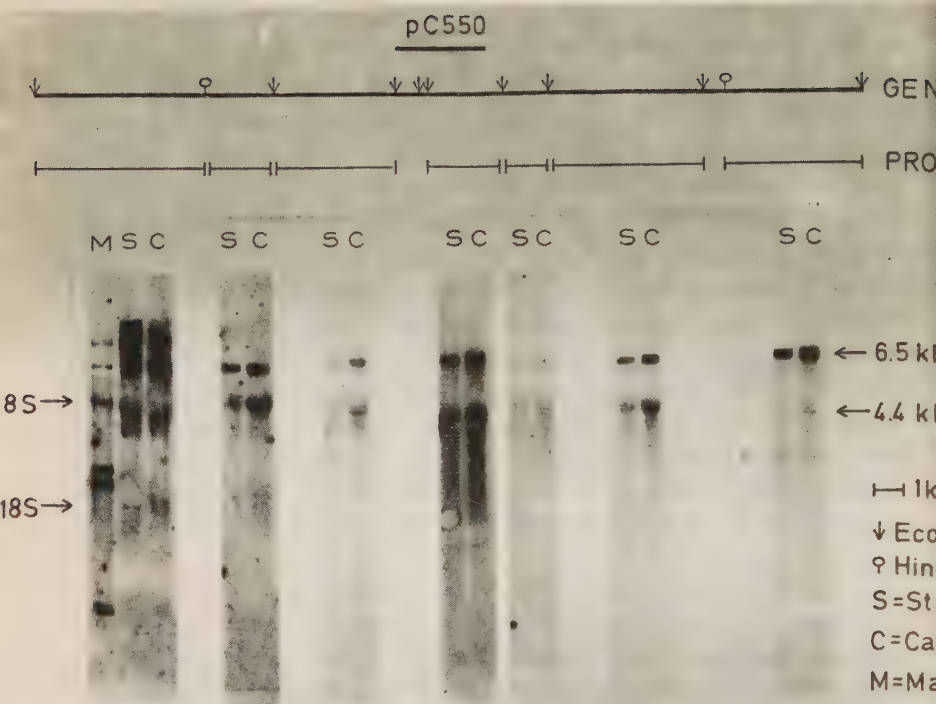


Abb.21: Northern-Blots von elektrophoretisch aufgetrennter Sterna- (S) und Calvaria-RNA (C); Hybridisierung mit nicktranslatierten genomischen Subklonen. Über dem Genombereich wird die Region angezeigt, die dem cDNA-Klon pC550 entspricht. Unter dem Genom sind die in den Subklonen enthaltenen Bereiche angedeutet. Marker: λ -DNA, gespalten mit Hin dIII und radioaktiv markiert an den 3'-Enden.

sehen. Jeder Subklon hybridisiert bei beiden Gewebsarten mit den zwei RNAs, ebenfalls der Längen 6.5 und 4.4 kb, wie der cDNA Klon. Aus diesem Hybridisierungsmuster läßt sich folgendes ableiten:

- (1) Da jeder Teilbereich eine positive Hybridisierung ergibt, enthält die ganze klonierte Region kodogene Sequenzen (dh., von ihr wird RNA transkribiert).
- (2) Da die Anzahl und die Länge der Banden, sowie die Signalintensität bei der Hybridisierung mit jedem Subklon gleich ist, darf angenommen werden, daß die ganze klonierte Region zur gleichen Transkriptionseinheit (=Gen) gehört.
- (3) Da außer der 6.5 und 4.4 kb Banden keine weiteren Signale erhalten wurden, wird wahrscheinlich von dieser Region keine andere RNA mit ≥ 300 Nukleotiden, ähnlicher oder größerer Häufigkeit transkribiert.
- (4) Der Anfang und das Ende des Gens können noch nicht lokalisiert werden. Falls sie sich noch innerhalb der erfaßten genomischen Region befinden, umfaßt der Genbereich mindestens 23 kb (entsprechend dem Abstand der äußersten Subklone). Durch spätere Experimente (weitere Subklonierungen des pST608-Subklons und Northern-Analyse mit gleichem Muster) konnte die Mindest-Genlänge auf ca. 27 kb geschätzt werden.
- (5) Da die Genlänge erheblich größer ist als jedes der reifen Transkriptionsprodukte, muß das primäre Transkript zu den mRNAs (durch Spleißen) prozessiert werden. Das bedeutet, daß Introns vorhanden sind; dies wurde auch durch Sequenzierung der zum C550 gehörenden genomischen Region direkt bestätigt (2).

10. Strukturelle Beziehung der C550 Transkripte zueinander

Die zwei reifen RNAs mit 6.5 und 4.4 kb sind höchstwahrscheinlich, zusätzlich zu der C550 Region, auch über größere Bereiche homolog (beide hybridisieren zu gleichen genomischen DNA Teilen, s. vorigen Abschnitt). Prinzipiell kann jede von *verschiedenen*, homologen (nicht-allelischen) Loci transkribiert werden. Im Falle, in welchem beide vom *gleichen* Locus transkribiert werden, muß differentielles "processing" des primären Transkriptes gefordert werden. Möglich sind differentielle Initiation, splicing, Termination und/oder Polyadenylierung.

Um diese Möglichkeiten einzugrenzen, wurde der strukturelle Zusammenhang zwischen den zwei RNAs näher untersucht, indem die C550-komplementäre Region auf den RNAs genau kartiert wurde. Kernenzym bei diesen Untersuchungen war RNase H (vgl. (216)). Das Prinzip der Methode ist in Abb.22A wiedergegeben: Das C550-Insert wird zu PolyA(+) RNA hybridisiert. Anschließend RNase H Behandlung des Ansatzes führt zum Abbau all derjenigen Regionen der RNAs, die zum C550 hybridisieren. Die Produkte des RNase H Verdau werden dann in einem Northern-Blot durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten, C550 flankierenden genomischen Subklonen (in Abb.22A als 1 und 2 bezeichnet) entdeckt: RNA Teile, die das 5'-Ende enthalten, mit einem Subklon, der in Promotor-Richtung liegt; solche, die das 3'-Ende enthalten, mit einem, der in Terminator-Richtung kartiert.

Die Durchführung des Experimentes ergab folgendes Bild (s.Abb.22B): Hybridisierung der RNase H Produkte⁸ im Northern-Blot mit Subklon pST5/5.3 (5' Richtung) führt zu einer einzigen Bande mit ca. 1.3 kb. Da also beide RNAs zu

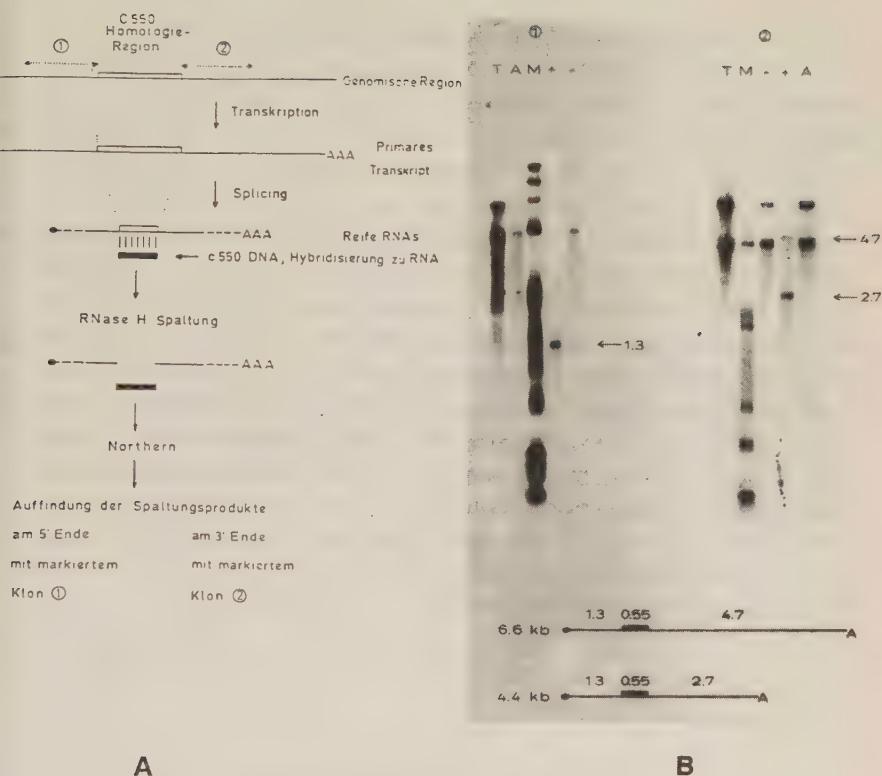


Abb.22A: Skizze des experimentellen Vorgehens bei der Kartierung von C550 auf der RNA-Transkripten. Der schwarze Punkt am 5'-Ende der RNA symbolisiert das *cap*, AAA symbolisiert den 3'-PolyA Trakt (s.Methode 22.2 für Einzelheiten). **B**, oben: Northern-Blots von elektrophoretisch aufgetrennter Calvaria-RNA. ①: Hybridisierung mit genomischem Klon pST5/5.3; ②: Hybridisierung mit genomischem Klon pST3/5.3; T: Total-RNA; A: PolyA(+) RNA; +: RNase H-Abbau von PolyA(+) RNA, nach vorheriger Hybrid-Ausbildung mit C550; -: RNase H-Abbau von PolyA(+) RNA, ohne vorheriger Hybrid-Ausbildung mit C550; M: Marker, wie in Abb.19. Die RNase H Produkte werden mit Pfeilen angedeutet (Länge in kb). Unten: Struktur der C550-RNAs bezüglich der C550-cDNA (vgl.Text).

einem Signal führen, erstrecken sich beide um 1.3 kb in 5' Richtung. Hybridisierung mit Subklon pST3/5.3 (3' Richtung) dagegen führt zu zwei Signalen mit 4.7 und 2.7 kb. Das bedeutet, daß die längere RNA noch 4.7 kb und die kürzere 2.7 kb von C550 aus in 3' Richtung aufweisen.

Wenn die Längen der Teilprodukte jeweils addiert werden, ergeben sich $(1.3 + 0.55 + 4.7 =) 6.55$ bzw. $(1.3 + 0.55 + 2.7 =) 4.55$ kb, Werte, die in guter Übereinstimmung mit den ursprünglichen Werten der reifen RNAs von 6.5 und 4.4 stehen (s.Schema unter 22B). Das bedeutet, daß alle Produkte des RNase H Abbaus erfaßt wurden. Es ergibt sich also folgendes Bild für die strukturelle Beziehung der C550-Transkriptionsprodukte: Die zwei RNAs besitzen einen gemeinsamen Initiationspunkt (bei Transkription von *einem* Locus den des gemeinsamen primären Transkripts) und verschiedene 3'-Enden, die am wahrscheinlichsten durch differentielle Polyadenylierung gebildet werden (vgl. auch Diskussion).

IV. TEIL: BAKTERIELLE EXPRESSION VON C550

Auf Grund der Gen- und RNA-Struktur (Anwesenheit von Introns und PolyA Terminus) ist es - in Analogie zu anderen Systemen - wahrscheinlich, daß das C550-Gen für ein Protein kodiert. Diese Vermutung wird durch die in vitro Translatierbarkeit der C550-RNA(s) stark unterstützt (2). Die Assoziation der C550 RNA-Expression mit bestimmten Geweben und Entwicklungsstadien (s.Abschnitt 3) läßt eine entscheidende Rolle des C550 Translations-Produkts bei der Ontogenese des Huhns erwarten. Im vierten Teil werden die Versuche beschrieben, die die Voraussetzungen zur Isolierung des C550-Proteins lieferten.

11. Strategie zur C550-Antikörper-Produktion

11.1 Prinzip: Bakterielle Expression von C550

Die erarbeiteten Informationen über die Genstruktur und den Expressionsmodus von C550 haben nicht erlaubt, das C550-Genprodukt zu identifizieren. Für seine Identifikation, sowie spätere Analyse und präparative Aufarbeitung, sollten spezifische Antikörper gegen C550 hergestellt werden. Dazu mußte zunächst das C550 DNA-Insert im Bakterium E.coli zum Polypeptid übersetzt werden. C550 hat einen einzigen, durchgehend offenen Leseraster in Transkriptionsrichtung (2); da C550 einen eher zentralen Bereich der mRNAs repräsentiert, ist dieser mit großer Wahrscheinlichkeit der Translationsraster des natürlichen Proteins. Dieses bakteriell erzeugte Polypeptid diente dann als Antigen zur Herstellung von Antikörpern, die das natürliche Huhnprotein erkennen sollten.

11.2 C550- β Galaktosidase Fusion zur Optimierung der Expression

Da für das C550 Produkt im Bakterium keine Identifizierungsmöglichkeit bestand (keine Antikörper, kein funktioneller Test), wurde beschlossen, C550 kovalent gebunden an ein bakterielles Protein exprimieren zu lassen, dessen Identifizierung und Isolierung keine Schwierigkeiten aufweist. Zu dieser Proteinfusion wurde β Galaktosidase herangezogen. Folgende konkrete Vorteile resultieren insgesamt aus dieser Konstruktion:

- (1) Es ist bekannt, daß Fusionen mit β Galaktosidase das Fremdprotein stabilisieren (verringert der Abbau) (Beispiele in (248-250)).
- (2) Die Identifizierung, Verfolgung der Anreicherung und schließlich die Isolierung von β Galaktosidase selbst, sowie Fusionen damit, können leicht über Anti- β Galaktosidase-Antikörper, bzw. über die β Galaktosidase-enzymatische Aktivität ausgeführt werden (s.unten).
- (3) Falls sich das Protein für die Bakterien als schädlich erweist, kann seine Expression über den *lacI* Repressor grundsätzlich kontrolliert werden.

11.3 Wahl des Vektors

Es erschien für die Reinigungsprozedur sinnvoll, eine Fusionseinheit zu konstruieren, die enzymatische Aktivität von β Galaktosidase nach Möglichkeit beibehält. Aus diesem Grund wurden alle Konstruktionen ausgeschlossen, die von

vornherein zum Verlust dieser Aktivität führen (wie z.B. Fusion an der Eco RI Stelle, 16 Aminosäuren vom C-Terminus der β Galaktosidase (251)).

Sowohl der N- als auch der C-Terminus von β Galaktosidase bieten sich als Anknüpfungsstellen für aktive Fusionen an. Bei C-terminalen Fusionen (252) kann man, bei voller β Galaktosidase Expression, vorzeitiges Abbrechen der C550-Übersetzung wegen Heterologie der Matrizen nicht ausschließen. Hingegen bedeutet β Galaktosidase Expression bei N-terminalen Fusionen auf jeden Fall Translation des Fremdproteins. Deshalb erschien es erfolgsversprechender, C550 an den N-Terminus von β Galaktosidase zu fusionieren.

Vom N-Terminus können bis zu 27 Aminosäuren entfernt oder ersetzt werden, ohne daß das Enzym seine Aktivität einbüßt (s. (253) und Referenzen (40,47) dort). Für eine erfolgreiche Translation der C550-*lacZ* Fusion sind zusätzlich erforderlich:

- (1) Ein Starter AUG-Kodon, da C550 selbst keines am Sequenzanfang besitzt.
- (2) Restriktionsstellen am *lacZ* N-Terminus, die eine Fusion im Translationsraster der β Galaktosidase an beiden C550-Enden erlauben (s.unten).

Zwei Arten von Vektoren genügen diesen Anforderungen : Solche, die das ganze *lacZ* Gen (253-258), und solche, die nur einen sehr kurzen, N-terminalen Teil davon (bezeichnet: *lacZ'*) tragen (pUC, pUR222, pUR250) (204,259-261); die β Galaktosidase Funktion wird bei den letzteren über α -Komplementation mit einem chromosomal kodierten "Komplementations-Akzeptor", *lacZ* Δ M15, erlangt (204).

Vektoren mit *lacZ* haben den Vorteil, daß sich damit recht stabile Hybridpeptide erzeugen lassen. Nachteilig ist, daß

auf Grund der unvermeidlichen Größe des Vektors nur wenige *einmal vorhandene* Restriktionsstellen vorhanden sind; diese erlauben nicht ohne mehrere kritische Manipulationen der DNAs eine Fusion in den richtigen Rastern. Bei *lacZ'*-Vektoren ergeben sich dagegen wegen der vielen einmaligen Restriktionsstellen keine größeren Schwierigkeiten. Wegen der Leichtigkeit der Konstruktion, wurde also zunächst das pUC9-Plasmid als Vektor für die Fusion gewählt. Damit blieb aber auch die Möglichkeit erhalten, die Fusionseinheit später in einen *lacZ* Vektor zu transferieren, wenn das sich als nötig erweisen würde (vgl.Abschnitt 16.).

12. pFP1-Konstruktion

Die Umklonierungsschritte, die zum neuen Plasmid pFP1 geführt haben, sind in Abb.23 schematisch wiedergegeben. Das pC550-Insert wurde hinter dem β Galaktosidase AUG-Startkodon in die Polyrestriktionsstelle, zwischen den Stellen *Hin* cII und *Bam* HI kloniert. Die kohäsiven *Bam* HI- Enden legen die richtige C550-Orientierung im pFP1 fest. Der einzige offene Leseraster (ORF) von C550 fällt bei der Ligation der *Bam* HI-Stellen (am 3'-Ende) von C550 und pUC9 mit dem von *lacZ'* zusammen. Für die richtige Junktion am 5'-Ende mußte die Sequenz GTCGAC mit *Hin* cII gespalten (GTC↓GAC) und zur aufgefüllten *Hin* dIII- Stelle von C550 ligiert werden, um ein durchgehendes Ablesen vom AUG der β Galaktosidase in den ORF von C550 zu gewährleisten (vgl.Abb.24). Durch die Junktion am 5'-Ende verändert sich die erste Aminosäure von C550 von Lys (AAG) zu Gln (CAG) (Abb.24). Die restlichen 181 Aminosäuren von C550 werden jedoch in das richtige Polypeptid übersetzt.

Transformation von JM 83 (20^a) mit dem Ligationsansatz ergab Lac⁺ Kolonien (blau auf X Gal-Platten). Für die

weitere Analyse wurden einige solche blauen Kolonien isoliert.

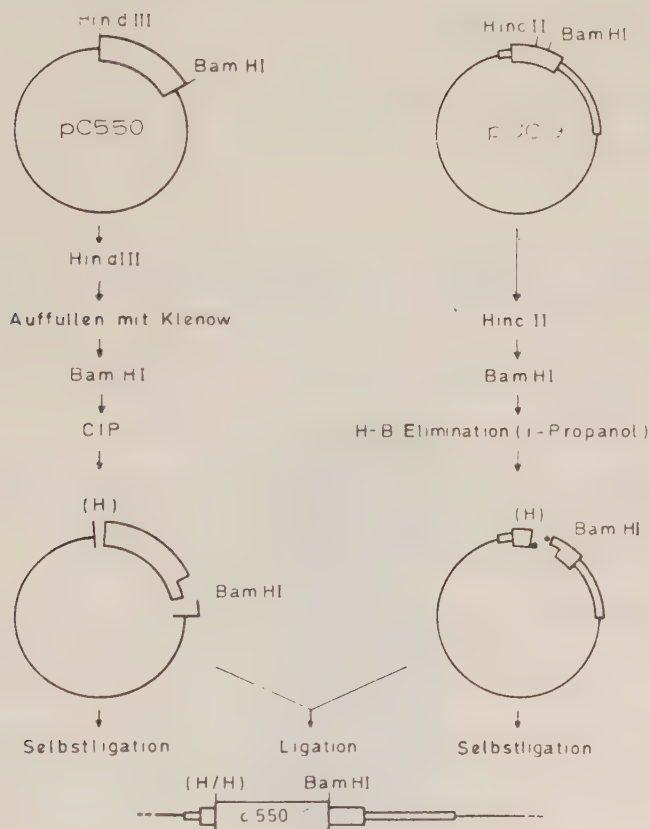


Abb.23: Schematische Darstellung der pFPI-Konstruktion. CIP: Phosphatase aus Kalbsdarm; (H): Die aufgefüllte Hin dIII Stelle; H-B: Das Hin cII-Bam HI Fragment; (H/H): Die Hin cII-Hin dIII Junktion (s.Abb.24); endständige Phosphatgruppen sind mit schwarzen Punkten angedeutet; das pC550-Insert wird mit dicken, die Polyrestriktionsstelle von pUC9 mit mittleren und das *lac z'* Gen mit dünnen Balken dargestellt (s.Methode 12.8 für Details).

13. Nachweis der Fusion

13.1 Auf DNA-Ebene

Zur Untersuchung der DNA-Struktur wurden die Plasmide einiger Lac⁺ Transformanten durch Mini-Lyse isoliert (s. Materialien und Methoden), und die superhelikalen Formen im Agarosegel analysiert. Plasmide mit verringerter Mobilität verglichen mit dem Vektor (d.h. mit DNA-Inserts) wurden weiter analysiert.

Die Identität des C550-Inserts und die richtige 3'-terminale Junktion von C550 mit pUC9 (Bam HI-Stelle) wurden durch Restriktionsendonuklease-Spaltungen gezeigt.

Die richtige 5'-terminale Junktion (der ursprünglichen Hin cII/Hin dIII-Stelle) wurde durch Sequenzierung bestätigt (Abb.24).

Somit weisen diese Plasmide die für pFP1 erwartete Struktur auf. Das Plasmid pFP1 hat eine Länge von 3.3 kb.

13.2 Auf Transkriptionsebene

Der Lac⁺ Phänotyp der pFP1-Transformanten bedeutet, daß die C550-Insertion die α Komplementation nicht beeinträchtigt. Obwohl die richtige DNA-Struktur von pFP1 (s.vorigen Abschnitt) eine notwendige Voraussetzung für die Fusionierung von C550 mit lacZ' ist, gibt sie keine Auskunft

über das tatsächliche Ausmaß der *Polypeptid fusion*; denkbar ist eine *kürzere* Polypeptidfusion auf Grund von C550-*interner* Initiation der Transkription bzw. Translation.

Bezüglich der Transkriptionskopplung der zwei Sequenzen *über ihrer ganzen Länge* wurde gezeigt, daß Expression vom *lacZ'*-Teil im pFP1 (mit vorgeschaltetem C550) weiterhin vom *lac*-Operator abhängt. Dazu wurde pFP1 in den *lacI*- überproduzierenden Stamm JM 103 (204) transformiert. Der Effekt des Repressors auf den LacZ Phänotyp von JM 103(pFP1) ist im LB-Medium meßbar: bei einer $OD_{600}=1$ werden pro ml Kultur mit IPTG durchschnittlich 300 U β Galaktosidase bestimmt (dh. die gleiche Aktivität wie beim JM 83(pFP1)); ohne IPTG - nur noch 20-30 U.

Einen drastischeren Effekt der Reduktion der β Galaktosidase-Aktivität erhält man durch Glukosezugabe ins Medium (262): Sowohl in JM 103(pFP1) (auch in Anwesenheit vom Induktor IPTG), als auch in JM 83(pFP1) sinkt die LacZ-Expression praktisch auf 0 U β Galaktosidase.

Da also die *lacZ'*-Expression im pFP1 der *lacI*- und Katabolit-Repression (262) unterliegt, wird die *lacZ'*-mRNA vom *lac*-Promotor transkribiert und muß die dazwischengeschaltete C550-Sequenz enthalten (vgl. auch Diskussion).

13.3 Auf Polypeptidebene

Da Antikörper, die gegen kommerzielle β Galaktosidase hergestellt wurden (s.Methode 29.), mit dem *lacZ'*-Fragment nicht reagieren (nicht gezeigt), mußte die pFP1-Fusion auf der Polypeptidebene durch andere Mittel gezeigt werden; dies erfolgte auf zwei Wegen, "genetisch" und "biochemisch".

13.3.1 Genetisch

Die Koexpression zweier Sequenzen zu zeigen, ist durch die Konstruktion von "polaren" Mutanten möglich; polare Mutanten sind solche, bei denen eine Mutation in der promotorproximalen Sequenz sich (auch) auf den promotor-distalen Teil auswirkt. Solche Mutanten lassen sich z.B.durch Auffüllen von geeigneten Restriktionsendonuklease-Stellen konstruieren, deren *Primär* effekt Rasterschub bei der Translation der folgenden Sequenz ist.

Im vorliegenden Fall von pFP1 wurde zu diesem Zweck die einmal vorhandene *Hin* dIII-Stelle gewählt, fünf Aminosäuren hinter dem AUG-Starter Kodon (s.Abb.25). Spaltung, Auffüllen der überstehenden Enden und Religation des Plasmids führt zu einer Netto-Insertion von vier Nukleotiden, also zu einem Rasterschub um +1(-2) in bezug auf den darauffolgenden β Galaktosidase-Raster. Zufällig ergibt sich hier zusätzlich die Ausbildung des *amber*-Kodons, UAG, das zum Kettenabbruch führt. Transformation von JM 83 mit diesem, sog. pFP1H⁻ Plasmid sollte dann zum Lac⁻ Phänotyp führen, da die zur α Komplementation nötige Sequenz *lacZ'* nicht mehr translatiert wird. Dies wäre der Nachweis, daß zur Synthese des *lacZ'*-Polypeptidteils Translation vom β Galaktosidase AUG-Starterkodon nötig ist und damit Kotranslation und *Fusion* des intermediären C550-Teils an die *lacZ'* -Sequenz.

Da diese Schlußfolgerung auf Grund einer *negativen* Aussage getroffen wird ("keine β Galaktosidase-Aktivität"), muß man den Erfolg aller Reaktionen eindeutig feststellen können, da jeder Fehler in der technischer Durchführung zur gleichen negativen Aussage führen kann; die Verlängerung der pFP1 Moleküle um 4 bp (beim pFP1H⁻ Plasmid) konnte durch die Untersuchung von Ligationstopoisomeren im Agarosegel nachgewiesen werden; die Analyseergebnisse sind in Abb.26 dargestellt: pFP1 wurde mit Hin dIII vollständig gespalten (Abb.26, Bahn 1); ein Teil wurde in einer monomolekularen Reaktion mit sich selbst ligiert (Abb.26, Bahnen 5 und 8); Hin dIII Spaltung dieser ligierten DNA führt wieder zu Linearisierung (Abb.26, Bahn 2). Ein zweiter Teil wurde zuerst mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und ebenfalls mit sich ligiert (Abb.26, Bahn 6). Hin dIII hat auf diese DNA keine Wirkung (Abb.26, Bahn 7). Wie in Abb.26, Bahnen 5 - 8, zu sehen ist, produzieren beide Ligationsreaktionen jeweils Bandenletermuster, die zueinander um einen halben Bandenabstand versetzt sind. Die Bandenleitern sind ringförmige

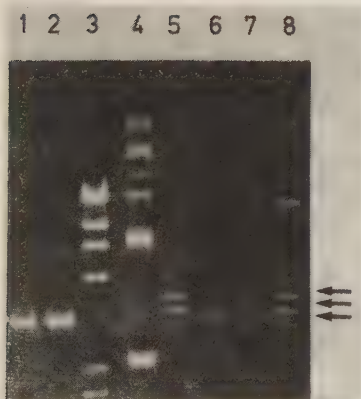
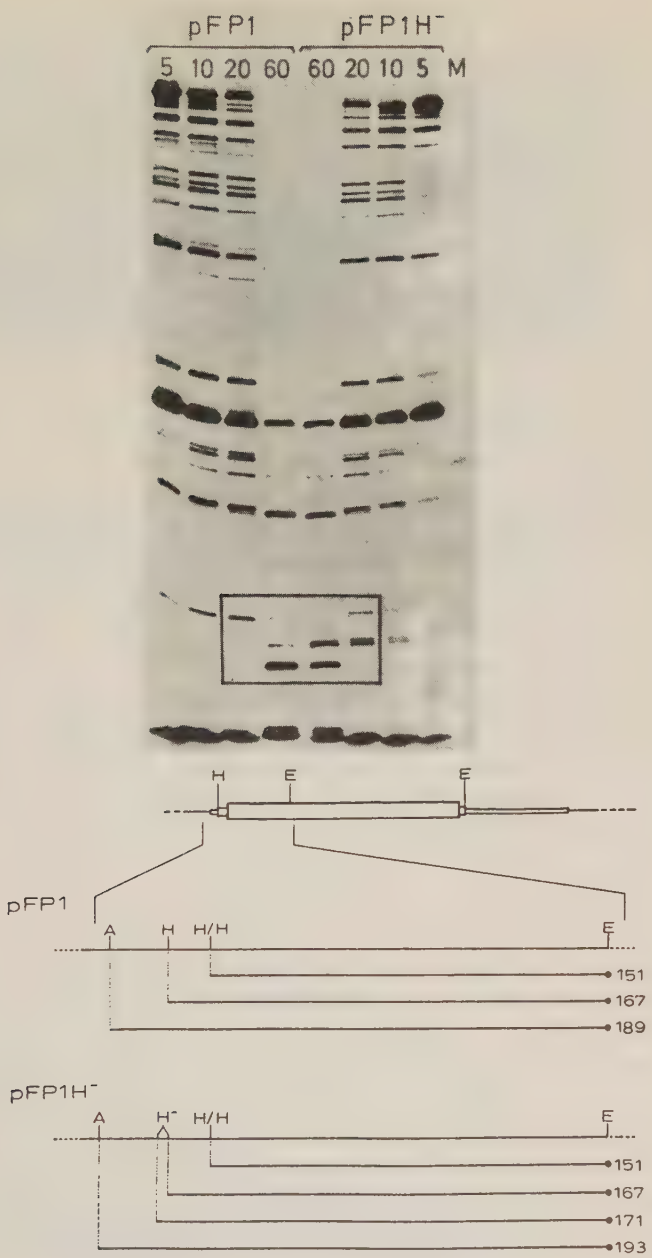


Abb.26: Elektrophoretische Analyse von pFP1 und pFP1H⁻. 1, 2: lineares pFP1; 3: Marker, wie in Abb.10; 4: pFP1, ungespalten; 5, 8: Ligationstopoisomere von pFP1; 6, 7: Ligationstopoisomere von pFP1H⁻ (Pfeile). Siehe Text für Einzelheiten.

DNA-Topoisomere, die sich im Verflechtungsgrad ("linking number") und Krümmungsgrad ("writhing number") jeweils um 1 unterscheiden. Die Insertion von 4 bp in pFPIH⁻ reicht *nicht* zur Ausbildung einer torsionsspannungsfreien DNA-Windung aus; deshalb verändert sie die Krümmung aller pFPIH⁻ Topoisomere gegenüber den pFPI Topoisomeren um ca 0.4 Einheiten. Dies hat diese *sichtbare* Verschiebung des Bandenmusters im Gel zur Folge. Durch diese Methode kann also auf *direkte* Art und Weise die Auffüllreaktion und die Ligierung von den glatten Enden kontrolliert werden. Dem Verfahren liegen die Arbeiten von Wang (263) zur DNA-Periodizität zu Grunde.

Das pFPIH⁻ Plasmid, wurde in den E.coli Stamm JM 83 transformiert. Wider Erwarten (vgl.oben) hat die Transformation *nur* Lac⁺ Kolonien hervorgebracht. (Da die aufgefüllte Hin dIII Stelle von der Endonuklease Alu I erkannt wird, konnte die erwartete DNA-Struktur der von den Transformanten isolierten pFPIH⁻ Plasmide durch Alu I-Partialspaltungen bestätigt werden, vgl.Abb.27). Dies bedeutet, daß, auch nach Entkopplung des lac AUGs von der lacZ' Sequenz, letzere durchaus noch translatiert werden kann.

Abb.27: Produkte von pFPI und pFPIH⁻ nach vollständiger Spaltung mit Eco RI, radioaktiver Markierung an den 3'-Enden und Partialspaltung mit Alu I. **Oben:** Autoradiogramm der Spaltungsprodukte nach elektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamid-Gel nach Laemmli (264). Die Zahlen geben die Inkubationsdauer in Minuten an. Der eingerahmte Bereich wird unten schematisch erläutert. M: Marker-DNA, pBR322, gespalten mit Hpa II und radioaktiv markiert an den 3'-Enden. **Unten:** Gezeigt wird das pFPI-Plasmid im Bereich der C550-Insertion (im Maßstab, vgl.Abb23)). Die hier analysierte Region in pFPI und pFPIH⁻ wurde vergrößert gezeichnet. H: Hin dIII; E: Eco RI; A: Alu I; H/H: Junktion, vgl.Abb.23; H⁻: Die aufgefüllte Hin dIII-Stelle. H und H/H werden von Alu I jeweils *einmal*, H⁻ *zweimal* erkannt und geschnitten; alle Alu I-Eco RI Produkte von dieser Region sind als waagerechte Linien angegeben; die radioaktive Markierung wird mit dem schwarzen Punkt angedeutet; die errechneten und die im Autoradiogramm gefundenen Fragmentlängen sind am Rand in bp angegeben.



Dieses Ergebnis führt zum Schluß, daß weitere Startmöglichkeiten rechts von der Hin dIII-Stelle existieren müssen. Die Durchsicht der C550-Sequenz (2) ergibt fünf weitere Stellen im gleichen Raster der β Galaktosidase (vgl. Abb. 29); 3 davon sind AUG-, 2 davon sind GUG-Kodons. Da sich auf C550 auch einige Ribosomenbindungsstellen befinden (265), sind die Voraussetzungen gegeben, daß Translationsinitiation an mindestens einem dieser Starts die Raster-schubmutation an der Hin dIII-Stelle supprimiert.

Um den postulierten Effekt dieser kryptischer Stellen der Translationsinitiation nachzuweisen, wurde, in gleicher Weise wie beim pFP1H⁻, ein Rasterschub von +1 in die einmal vorhandene Bam HI-Stelle eingeführt, also an der Junktionsstelle zwischen C550 und lacZ' (s. Abb. 25). JM 83-Bakterien, die mit diesem pFP1B⁻ Plasmid transformiert werden, weisen einen zwischen Lac⁺ und Lac⁻ intermediären Lac Phänotyp auf (hellrot auf McConkey+Laktose Platten (266), s. Abb. 28B). Gleiches gilt auch für das pFP1E⁻ Plasmid (s. Abb. 25), das über einen Umweg konstruiert wurde (hier wurde die Eco RI-Stelle der Polyrestriktionsstelle aufgefüllt, s. Materialien und Methoden). Die Reduktion des Lac⁺ Phänotyps weist auf eine notwendige Polypeptidfusion (zur Erhaltung des vollen Lac⁺ Phänotyps) hin.

Um die Analyse zu vervollständigen und um eine Erklärung für die nur partielle Lac⁺ → Lac⁻ Konversion zu finden, wurde die pFP1-Expression weiter untersucht: Dieses Phänomen fordert bei pFP1B⁻ bzw. pFP1E⁻ die Benutzung eines Startkodons, das um 1 Nukleotid gegenüber dem β Galaktosidase-Raster versetzt ist. Dafür bietet sich ein einziges GUG-Kodon im C550-Teil (knapp vor der C550/lacZ' Junktionsstelle, s. Abb. 25). Translation von diesem GUG-Kodon in die lacZ' Sequenz würde bei pFP1B⁻ bzw. pFP1H⁻ zur Synthese eines α Komplementations-fähigen Peptids führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde, von pFP1E⁻ ausgehend, die "Doppel-Mutante" pFP1B⁻E⁻ konstruiert (s. Methode 12.9). Mit

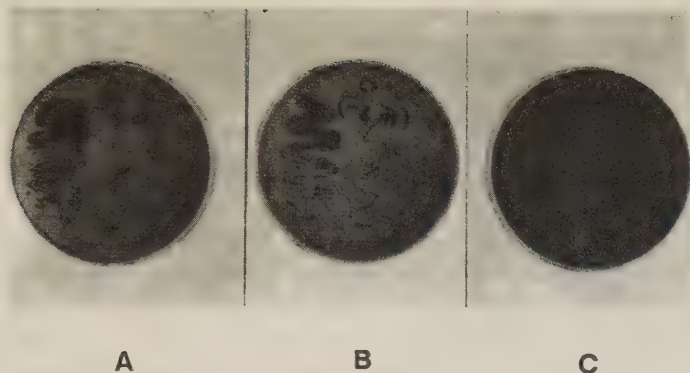


Abb.28: Untersuchung des Lac-Phänotyps von JM 83 mit pFP1 bzw. Derivaten auf McConkey+Laktose Platten. A: pFP1H⁻; pFP1 erzeugt den gleichen Phänotyp. B: pFP1B⁻; pFP1E⁻ erzeugt den gleichen Phänotyp. C: pFP1B E⁻.

einer Gesamtinsertion von 8 Nukleotiden (an den Bam HI und Eco RI-Stellen) wird hier der β Galaktosidase Raster um +2(-1) verschoben; die soeben angenommene Translation vom GUG wird um +1(-2) verschoben; da auch sonst keine andere Suppressionsmöglichkeit besteht, sollte Transformation von JM 83 mit pFP1B⁻E⁻ reine Lac⁻ Kolonien hervorbringen - was tatsächlich auch der Fall war (s.Abb.28C).

Die umfassende genetische Analyse von pFP1 und Derivaten liefert also folgende Erkenntnisse:

- (1) Durch pFP1 B⁻E⁻ wurde gezeigt, daß zwischen C550 und *lacZ'* eine Fusion auf Polypeptidebene vorliegt.
- (2) Durch pFP1H⁻ wurde nachgewiesen, daß diese Fusion nicht notwendigerweise die ganze C550 kodierende Region einschließt, und daß auf jeden Fall auch kürzere Fusionen des C550-Teils mit *lacZ'* vorliegen müssen.

- (3) Durch pFP1B⁻ bzw. pFP1E⁻ wurde entdeckt, daß Translation im Fusionsbereich auch an anderen Starter-Kodons ansetzt, die nicht immer im β Galaktosidase-Raster liegen.

13.3.2 Biochemisch

Um einerseits die Resultate der genetischen Analyse zu bestätigen und andererseits um festzustellen, wieviele und welche aller möglichen pFP1-Fusionspeptide tatsächlich gemacht werden, wurden diese *direkt* in einem zellfreien, prokaryotischen, gekoppelten Transkriptions/Translations-System (267) durch ³⁵S-Methionin Markierung analysiert.

Folgende Schriftkonventionen werden im folgenden benutzt (s.auch Abb.29A): Die Startkodons im β Galaktosidase-Raster werden in N→C Richtung mit a - f bezeichnet. "a" ist das *lacZ* AUG-Kodon; b - f sind C550-interne Kodons. c, d und e sind unmittelbar benachbart und die Unterscheidung ihrer Peptide ist kaum möglich. Der Einfachheit halber wird deshalb stellvertretend nur die Translation von e betrachtet und die von c und d im weiteren vernachlässigt. Das GUG-Kodon, das sich *nicht* im β Galaktosidase-Raster befindet, und dessen Funktionalität gezeigt wurde (Lac^+ in pFP1B⁻ bzw. pFP1E⁻, s.vorigen Abschnitt), wird als Kodon "g" bezeichnet.

Aus der bekannten pFP1-DNA Sequenz läßt sich die Aminosäurezahl, also auch das Molekulargewicht der Fusionspeptide errechnen, die sich, je nach Translationsstart, in ihrem N-terminalen Teil unterscheiden, aber den C-Teil (*lacZ'*) gemeinsam haben. Translation von a, b, e und f erzeugt Peptide mit einem Molekulargewicht von 36.5, 30.3, 26 und 16 kd. Die Ergebnisse der in vitro Translationen sind in Abb.29B dargestellt. Im Vergleich zum Vektor pUC9 treten bei pFP1 zwei neue Polypeptid-Banden auf mit 26 und 16 kd; sie entsprechen den Fusionspeptiden e und f. Peptid a erscheint nicht. Die

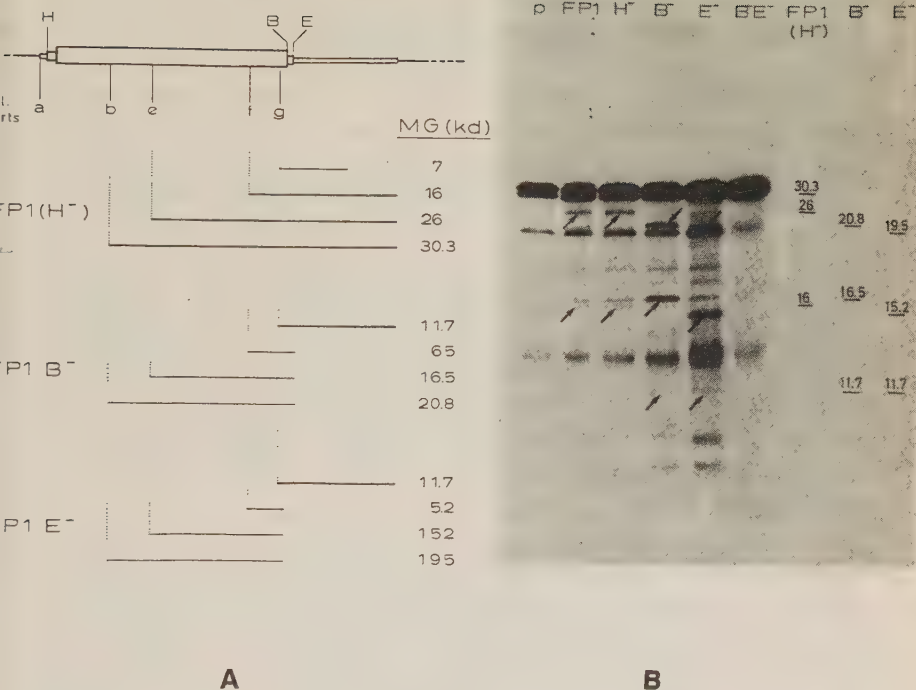


Abb.29: In vitro-Transkription/Translation von pFP1 und Derivaten. **A:** Schematische Darstellung von pFP1 (im Maßstab, vgl. Abb.23) und der postulierten Peptide von den Translationsstartkodons b, e, f und g in pFP1 und seinen Derivaten (vgl. Text). H: Hin dIII; B: Bam HI; E: Eco RI; MG: errechnetes Molekulargewicht. **B:** ³⁵S-Methionin-markierte Produkte. p: pUC9; FP1: pFP1; H⁻: pFP1H⁻; B⁻: pFP1B⁻; E⁻: pFP1E⁻; B⁻E⁻: pFP1B⁻E⁻. Die Pfeile zeigen die im Vergleich zum pUC9 neu auftretenden Banden in den restlichen Plasmiden an; ihre Molekulargewichte sind rechts angegeben.

Beobachtung der Bande mit 30.3 kd (Peptid b) wird durch die Interferenz mit den starken β Laktamase-Signalen unmöglich gemacht. Das gleiche Muster wird (erwartungsgemäß) bei der Analyse von $pFP1H^-$ gefunden (Abb.29B, Bahn H^-).

Um die Benutzung auch von Kodon b zu demonstrieren, wurde das Polypeptid-Muster von $pFP1B^-$ bzw. $pFP1E^-$ analysiert. Durch die DNA-Modifikationen in diesen Plasmiden erfahren alle synthetisierten Peptide eine voraussagbare Verkürzung (s.Abb.25 und 29A). Bei $pFP1B^-$ beträgt sie 73 Aminosäuren; bei $pFP1E^-$ sind das 83 Aminosäuren. Translation von Kodon b führt dann zu einem 20.8 kd Peptid bei $pFP1B^-$ bzw. 19.5 kd Peptid bei $pFP1E^-$; Peptide mit genau diesen Molekulargewichten werden auch gefunden (Abb.29B). (Auf dem Autoradiogramm in Abb.29B sind auch die Peptide sichtbar, die vom Kodon e bei $pFP1B^-$ (16.5 kd) bzw. $pFP1E^-$ (15.2 kd) translatiert werden.) Nach diesen Ergebnissen wird also Kodon b ebenfalls benutzt.

Die Analyse von $pFP1B^-$ und $pFP1E^-$ bestätigt darüber hinaus die Existenz des geforderten Peptids g (übereinstimmend mit dem errechneten Wert von 11.7 kd), welches in beiden Plasmiden die Funktion des α Komplementations-Donors übernimmt (s.Abb.29). Wie das Bandenmuster erkennen läßt (Abb.29B, Bahn B^-E^-), wird in der Doppel-Mutante $pFP1B^-E^-$ kein komplementationsfähiges Peptid synthetisiert.

Der Nachweis des Fusionspeptids a, welches vom physiologischen lac AUG translatiert werden sollte, ist durch diese Methode nicht gelungen. Limitation in der Kapazität des in vitro Systems ist der wahrscheinlichste Grund dafür (vgl. Diskussion).

Durch die direkte biochemische Analyse ist also gezeigt worden, daß von 6 möglichen Translationsstarts (a - f) in $pFP1$ auf jeden Fall mindestens 3 (b, e, f) zur Synthese von Fusionspeptiden zwischen C550 und lacZ' benutzt werden können.

14. Präparative Trennung der pFP1-Peptide

14.1 Anreicherung über pAPTG-Sepharose

Wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, ist Translation zumindest vom C550-internen Start-Kodon b in pFP1 möglich. Da dies die Übersetzung von mindestens 3/4 der C550-Sequenz in Polypeptid bedeutet (136 Aminosäuren), ist es sinnvoll, die bakteriell erzeugten Proteine als Antigene einzusetzen. Es wurde zuerst versucht, die Fusionspeptide mit dem α Komplementations-Akzeptor *lacZ* Δ M15 Molekül als β Galaktosidase-aktive Komplexe zu isolieren. Indem die enzymatische Funktion die Grundlage der Isolierung bildet, ist es möglich, die Integrität der Komplexe durch Kontrolle der β Galaktosidase-Aktivität bei jedem Reinigungsschritt zu überprüfen. Die Expression von pFP1 hat nach bisheriger Erfahrung keine schädlichen Auswirkungen auf die Bakterien; deshalb wurde für die Isolierung von größeren Mengen von pFP1-Polypeptiden der Stamm JM 83(pFP1) gewählt (Δ *lacI*), der sie konstitutiv produziert.

2 l Kultur wurden gewöhnlich aufgearbeitet (für Details vgl. Methode 25.1). Der zytosolische Extrakt wurde über eine pAPTG-Sepharose-Säule (268) gegeben (Abb.30A). Der Proteingehalt repräsentativer Fraktionen wurde gelelektrophoretisch analysiert. Wie der Abb.30B zu entnehmen ist, wird durch diesen Schritt eine effiziente Abreicherung von β Galaktosidase-unspezifischen Proteinen erzielt. Bei einer hohen Ausbeute (um die 80 %) erreicht man dadurch eine Steigerung der spezifischen β Galaktosidase-Aktivität um einen Faktor zwischen 70 und 100 (s.Tabelle 4). Der Aktivitätspool ist

jedoch noch nicht ganz frei von kontaminierenden, anderen Proteinen (vgl. Diskussion). Deshalb gelingt an dieser Stelle eine eindeutige Zuordnung der pFP1-Fusionsprodukte (im Gegensatz zum Komplementations-Akzeptor M15, s. Abb. 30B) zu den Proteinbanden nicht.

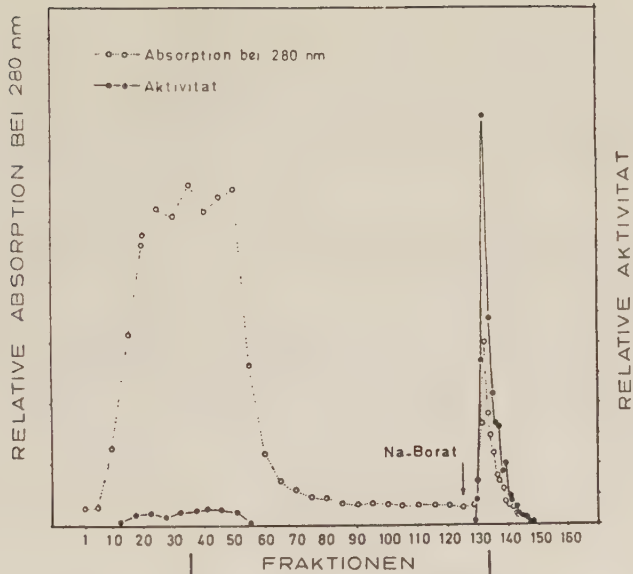
	2 l Übernacht- Kultur	Zellen nach U-Schall	Zytosol. Über- stand	Protein Durch- fluß	Aktivitäts- pool
Aktivität *) ($\times 10^5$ U)	7	7	6.3	0.48	5.2
Protein- inhalt **) (mg)	-	-	1340	1200	15.4
Spezifische Aktivität (U/mg Protein)	-	-	470	40	33766

Tabelle 4: Quantitative Auswertung der Anreicherung von pFP1/M15-Komplexen durch pAPTG-Säulen-Chromatographie.

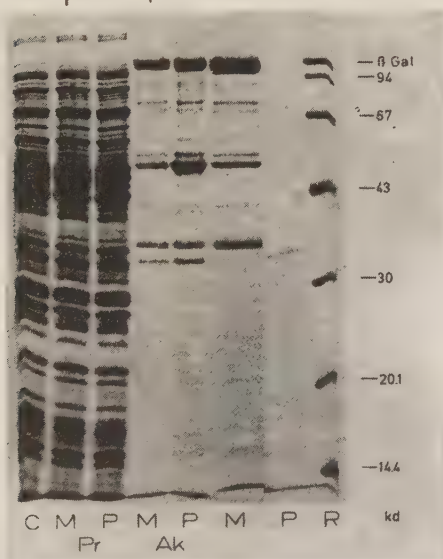
*) gemessen durch ONPG-Hydrolyse

**) geschätzt durch die 280nm Absorption

Abb. 30: Präparative Auftrennung der pFP1/M15-Komplexe. **A:** Profil der pAPTG-Säulen-Chromatographie des bakteriellen Zytosols. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der Natriumborat-Zugabe. Die β Galaktosidase-Aktivität wurde durch ONPG-Hydrolyse bestimmt (vgl. Methode 27.2). **B:** Gelelektrophoretische Analyse von Aliquoten der Säulenfraktionen. **C:** Gesamter Zytosolextrakt; **M:** Maximum; **P:** pool; **Pr:** Nicht-gebundener Zytosolrest; **Ak:** β Galaktosidase-Aktivität; **R:** Molekulargewichtsmarker. Die Bahnen 6 und 7 zeigen die Analyse von Fraktionen eines zweiten Säulenlaufs mit dem Aktivitätspool vom ersten Säulenlauf (vgl. Text).



A



B

14.2 Vollständige Reinigung über nicht-denaturierende Elektrophorese

Eine weitere Anreicherung der Fusionspeptide über erneute Affinitätschromatographie ist nicht möglich (s. Abb. 30B). Da die β Galaktosidase ein sehr großes Molekulargewicht besitzt (269), könnte es möglich sein, die pFP1/M15-Komplexe durch Gelelektrophorese nach Laemmli (264) unter *nicht-denaturierenden* Bedingungen von den übrigen Proteinen vollständig zu trennen.

A

B

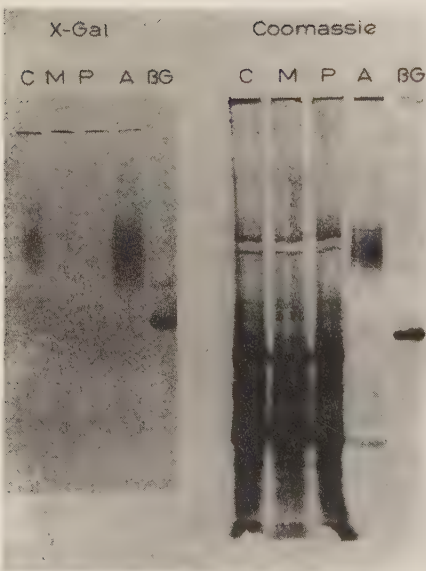


Abb. 31: Gelelektrophoretische Auftrennung von bakteriellen Proteinen unter nichtdenaturierenden Bedingungen. C, M, P: wie in Abb. 30B; A: Aktivitätspool; β G: kommerzielle β Galaktosidase. A: Färbung des Gels durch X Gal-Spaltung. B: Färbung des Gels mit Coomassie.

Das Ergebnis des Versuchs, die aktiven Komplexe im nativen Gel zu reinigen, ist in Abb.31B dargestellt. Im oberen Gelteil erscheint nur noch ein Coomassie-färbbarer "Fleck", wohl über dem β Galaktosidase-Tetramer (Bahn A), wobei die restlichen Proteinspezies eine erheblich größere Mobilität aufweisen (unterer Gelteil). Um zu beweisen, daß der Proteinfleck die erwarteten Aktivitätskomplexe repräsentiert, wurde im Parallelansatz das Gel mit X Gal als β Galaktosidase-Substrat angefärbt (Abb.31A); der Aktivitätsfleck, der im Cytosolextrakt sowie im Säulen-Elutionspool erscheint, fällt mit dem Proteinfleck in Abb.31B, Bahn A zusammen. Durch die sukzessive Anwendung von pAPTG-Affinitäts-Chromatographie und nativer Disk-Elektrophorese des Aktivitätspools gelingt es also, die pFP1/M15-Komplexe vom bakteriellen Extrakt vollständig zu trennen.

Die Tatsache, daß die aktiven Komplexe nicht als scharfe Bande erscheinen, weist darauf hin, daß *mehr als eine* pFP1-Spezies die β Galaktosidase Funktion in vivo komplementieren kann; daher gibt es mehrere Möglichkeiten der Zusammensetzung der 4 Donoren jedes einzelnen, aktiven Komplexes. Man kann errechnen (s.Methode 35.), daß es bis zu 35 aktive Komplexe gibt, die auf Grund ihres leicht unterschiedlichen Molekulargewichtes im nativen Gel als dicht aufeinanderfolgende Proteinbanden erscheinen.

15. Anzahl und Eigenschaften der pFP1-Peptide in vivo

Die Möglichkeit, die aktiven Komplexe über native Gele zu reinigen, erlaubt auch die Richtigkeit einiger Annahmen über den Zustand der pFP1-Peptide zu überprüfen. Hierzu wurde der Polypeptidgehalt des Aktivitätsflecks in situ analysiert. Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren (s.Methode 1.8 für Details):

Ein Aliquot des Aktivitätspools wurde nativ im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit X Gal gefärbt (s. Abb. 32, oben; vgl. auch Abb. 31A). Der Gelstreifen wurde in SDS äquilibriert und die Polypeptide in der 2. Dimension in einem denaturierenden Gel analysiert (Abb. 32, unten). Unter dem Aktivitätsfleck dissoziieren die Komplexe in ihre Bestandteile: Den Komplementations-Akzeptor M15 und die vier pFPl-kodierten Komplementationsdonoren. Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- (1) in vivo werden Fusionspeptide von *allen vier* Startkodons a, b, d und f synthetisiert (vgl. Abschnitte 13.3.1 und 13.3.2).
- (2) *Alle vier* Fusionspeptide vermögen M15 zu komplementieren.
- (3) Entgegen ihrer Instabilität im freien Zustand (vgl. (245)) scheinen die Fusionspeptide, sobald sie mit dem Komplementations-Akzeptor assoziiert sind, resistent gegen Proteolyse zu sein (*keine* Reduktion des erwarteten Molekulargewichtes).
- (4) Die in Abb. 32 angedeutete Profilverschiebung der dissoziierten Fusionspeptide relativ zur Laufrichtung läßt darauf schließen, daß sich die einzelnen Spezies der aktiven Komplexe in der Tat in der Elektrophorese der ersten Dimension ihrem Molekulargewicht entsprechend anordnen.

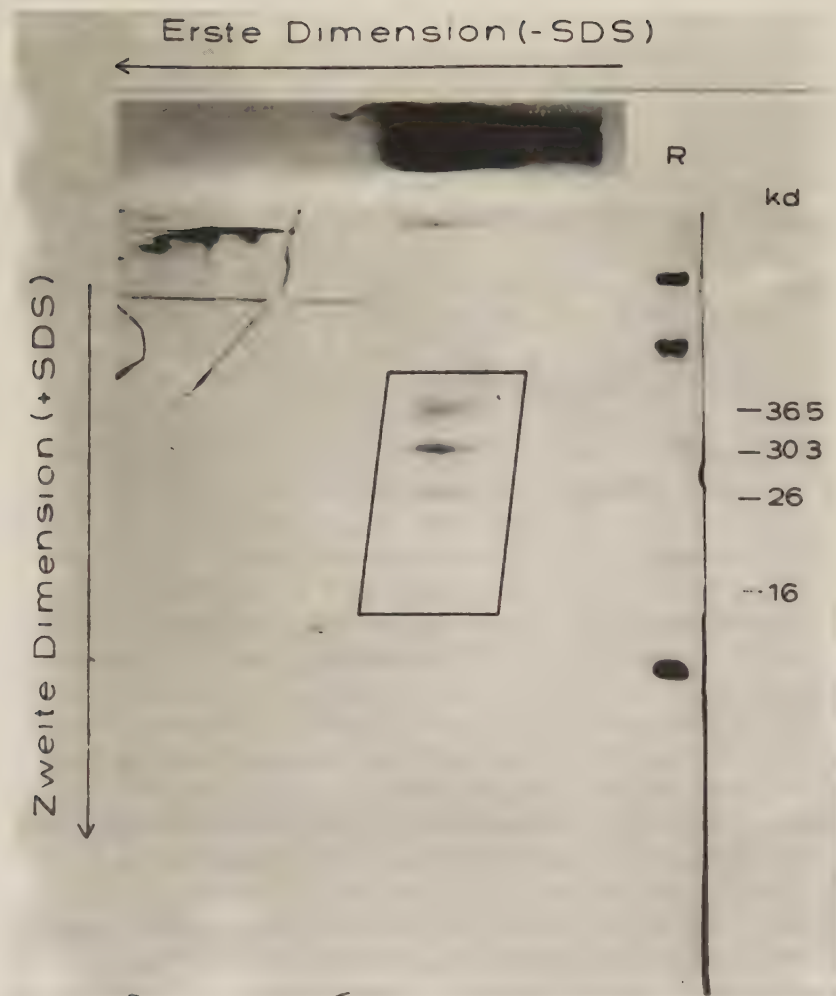


Abb.32: pFP1-Polypeptid-Analyse durch 2D-Elektrophorese und Silberfärbung. Siehe Text. R: Molekulargewichtsmarker, aufgetrennt in der zweiten Dimension; die Molekulargewichte der pFP1-Peptide sind angegeben.

16. pFP2-Konstruktion

Die Gewinnung der C550-Proteine als Fusionen mit dem N-terminalen *lacZ'* Teil weist bei der präparativen Aufarbeitung zwei grundsätzliche Nachteile auf:

- (1) Die Polypeptidausbeute (gemessen in β Galaktosidase Äquivalenten) ist vergleichsweise gering (in etwa nur 1/10 der Aktivität von Wildtyp- β Galaktosidase unter gleichen Wachstumsbedingungen).
- (2) Da die Anreicherung über die Affinitäts-Chromatografie keine reinen Fusionspeptide liefert, ist die ständige Kontrolle der Intaktheit des C550 Teils relativ aufwendig (native und 2D-Elektrophorese).

Aus diesen Gründen wurde beschlossen, C550 an das ganze β Galaktosidase-Molekül zu fusionieren; dadurch sollte den Fusionspeptiden eine größere Stabilität in der Zelle verliehen werden; auch ihr Nachweis wäre in diesem Fall mit Hilfe von Anti- β Galaktosidase-Antikörpern (die mit pFP1 bzw. *lacZ'* nicht reagieren) leicht möglich. Dabei konnten die bei der Expressionsanalyse von pFP1 gewonnenen Daten für die neue Konstruktion voll verwertet werden (s.unten).

Für die neue Konstruktion wurde der Vektor pMC1871 benutzt (270) (s.Abb.33). Dieser Vektor trägt ein *lacZ'* Gen, wovon der Promotor, Operator und die ersten acht Aminosäuren von *lacZ* deletiert sind. pMC1871 Transformanten sind demnach vollständig *LacZ⁻*. Unmittelbar vor *lacZ'* befindet sich die einmal vorhandene Sma I Stelle. In diese Stelle wurde das Pvu II-Fragment von pFP1 umkloniert (s.Abb.33). Dieses Fragment trägt den *lac* Promotor und Operator, den β Galaktosida-

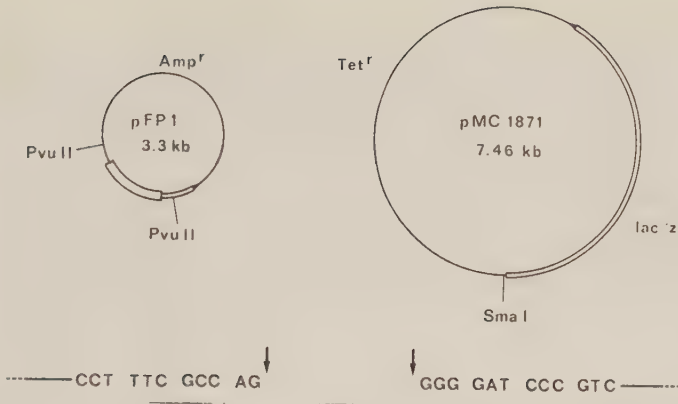


Abb.33: Die Plasmide pFP1 und pMC1871 (im Maßstab). Die C550-Region wird mit dicken, die *lacZ* Regionen mit dünnen gebogenen Balken symbolisiert; *Amp^r*: Ampizillin-Resistenzgen; *Tet^r*: Tetrazyklin-Resistenzgen; Unten ist die Sequenz der Junktion zwischen der rechten Pvu II- (pFP1) und Sma I- (pMC1871) Stellen im β Galaktosidase-Raster angegeben.

se Start, den ganzen C550 Teil und noch 89 bp des *lacZ* Gens (Aminosäuren 6 bis 34 2/3 vom Wildtyp β Galaktosidase-Gen). Für die Interpretation der Umklonierungsergebnisse sind folgende drei Aspekte wichtig:

- (1) Da Sma I bzw. Pvu II glatte DNA-Enden produzieren, ist eine Insertion in *beiden* Orientierungen möglich.
- (2) Weder der Translationsraster vom β Galaktosidase-AUG (im pFP1) noch vom GUG-Startkodon g (vgl. Abschnitte 13.3.1 und 13.3.2) stimmen mit dem β Galaktosidase-Raster hinter der Sma I Stelle überein. Deshalb ist das *primäre* Ligationsprodukt phänotypisch *Lac⁻* (s. unten).
- (3) Eine DNA-Strecke von 80 bp des *lacZ* Gens befindet sich sowohl auf dem Pvu II-Insert, als auch auf dem pMC1871-Vektor. Dies kann in einem *recA⁺* E.coli Stamm zu homologer Rekombination führen.

Details über die Umklonierung sind der Methode 12.10 zu entnehmen. Die Ligationsansätze wurden in CSH 50 (Δlac , $recA^+$) transformiert, und die Klone auf Tetrazyclin-Agar (entweder LB+X Gal oder McConkey+Laktose) selektiert. Kolonien mit vier verschiedenen Phänotypen wurden dabei erhalten (vgl. Abb. 34). Auf X Gal sind das:

- (1) **Hellblaue Transformanten:** Das sind Bakterien, die das Pvu II-pFP1 Insert in der *lac'Z* Orientierung enthalten. Auf Grund des Rasterschubs (s.o.) sind sie $LacZ^-$, wegen "misreading" aber werden mitunter auch aktive β Galaktosidase Moleküle synthetisiert, welche zur leicht blauen Färbung führen; das Plasmid, welches diesen Phänotyp bewirkt, heißt pFP2-t.
- (2) **Hellblaue Transformanten mit dunkelblauen Sektoren:** Die 5'-terminale Homologie von den *lacZ* Bereichen (s.o.) führt bei Bakterien mit pFP2-t (mit einer Frequenz von 1.36×10^{-8} pro Zelle und Generation, s. Methode 36.) zu Rekombination und damit Eliminierung des Rasterschubs durch Deletion; die *lac'Z* Region wird richtig translatiert ($LacZ^+$ Sektoren). Das neue Plasmid heißt pFP2.
- (3) **Weiße Transformanten:** a) Diese können den rekonstituierten Vektor pMC1871 ohne Insert enthalten. b) Weiß sind auch Bakterien, die das Insert im Vektor in der umgekehrten Orientierung enthalten; da hier keine Transkription von *lac'Z* stattfindet, sind sie vollständig Lac^- . Diese Plasmide heißen pFP2-uk.
- (4) **Weißer Transformanten mit dunkelblauen Sektoren:** Ähnlich wie unter Punkt (2) kann auch pFP2-uk rekombinieren. Die erfolgte DNA-Inversion hat den gleichen phänotypischen Effekt wie bei pFP2 (Lac^+ Sektoren). Die Plasmide heißen pFP2-v.

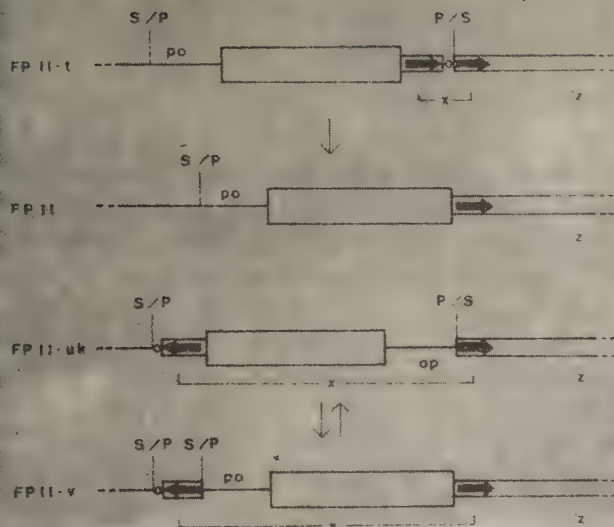


Abb.34: Schematische Darstellung und Kolonienmorphologie der pFP2-Rekombinationsprodukte. Die C550-Region wird mit dicken, die lacZ-Regionen mit dünnen Balken symbolisiert; der Rasterschub in der Junctionsstelle (s.Text) ist als kleiner Kreis gezeichnet; die dicken Pfeile markieren die DNA-Homologie-Regionen im Pvu II-Fragment (grün) und im pMC1871-Vektor (rot) (s.Text); S/P und P/S: Junctionsstellen zwischen Pvu II und Sma I; p: Promotor; o: Operator; x: Rekombinationsstellen in vivo; die Pfeile geben die Richtung der Rekombination in vivo an. Vgl.Text für die Erläuterung der Kolonienmorphologie.

Die von den Phänotypen abgeleitete DNA-Struktur aller pFP2-Plasmide wurde durch Restriktionsspaltungen bestätigt. Stabile und einheitliche Plasmide konnten durch Transformation in den Stamm F'11recA (260) erhalten werden.

17. Nachweis der pFP2-Polypeptidsynthese

Nur das Plasmid pFP2 war für das Ziel der Antigenherstellung von Bedeutung. Auf Grund des bekannten Translationsmusters der pFP1-Konstruktion wurde erwartet, daß pFP2-Translation zu mindestens vier Fusionspeptiden führt, die alle C-terminal das *gesamte* β Galaktosidase Molekül (ab Aminosäure 5), N-terminal aber, je nach Startkodon a, b, d oder f (s. Abschnitt 13.3.2), verschieden lange Teile der C550 Sequenz tragen. Um diese Fusionspeptide nachzuweisen, wurden alle bakteriellen Proteine in vivo mit ^{35}S -Methionin markiert (s. Methoden 26.2 und 32.), und eine Immunpräzipitation mit Anti- β Galaktosidase Antikörpern wurde durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abb. 35 dargestellt. Im Vergleich zur β Galaktosidase-Referenzbande (definiert: 116 kd) treten bei Bakterien, die pFP2 enthalten, vier Banden auf, die den errechneten Molekulargewichten für die pFP2-Peptide entsprechen (140.7, 134, 129.7 und 119.7 kd). Im Gegensatz zu den pFP1-Peptiden scheint hier das von Kodon f translatierte Peptid in der Überzahl zu sein (vgl. hierzu nächsten Abschnitt).

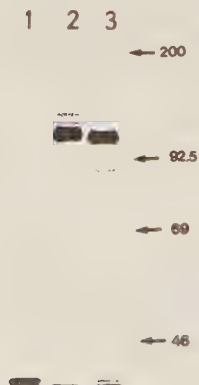


Abb. 35: Autoradiogramm von elektrophoretisch aufgetrennten, ^{35}S -Methionin-markierten bakteriellen Produkten, nach Immunpräzipitation mit Anti- β Galaktosidase Antiserum. 1: F'11recA(pMC1871); 2: F'11recA(pFP2); 3: C 600.

18. Präparative Isolierung der pFP2-Polypeptide

Zur präparativen Gewinnung der pFP2-Peptide wurde ähnlich wie bei der pFP1-Präparation verfahren (s.Abschnitt 14.1). F'llrecA Bakterien mit pFP2 weisen pro ml LB und $OD_{600}=1$ eine β Galaktosidase Aktivität von ca.3000 U auf. Dies ist 10mal mehr als mit pFP1 unter gleichen Bedingungen (s.Abschnitt 14.1 und 16). Somit wurde das Ziel der Produktionssteigerung erreicht.

Die β Galaktosidase Aktivität wurde ebenfalls über pAPTG-Säulenchromatographie angereichert. Die Proteinanalyse der verschiedenen Fraktionen wird in Abb.36A gezeigt. In einem Parallelexperiment wurden die gleichen Fraktionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulose übertragen (Western-Transfer) (271) und die β Galaktosidase Fusionsproteine in allen Fraktionen mit Anti- β Galaktosidase-Antikörpern identifiziert. Das Ergebnis der Reaktion mit dem Aktivitätspool ist in Abb.36B gezeigt. Auf diese Weise kann die Anreicherung der vier pFP2-Peptide verfolgt und ihre Intaktheit leicht überprüft werden. Die vier Polypeptidbanden, die im Aktivitätspool angereichert werden (Abb.36A), sind also auf Grund ihrer Affinität zu pAPTG, ihres Molekulargewichtes und ihrer Reaktivität mit Anti- β Galaktosidase Antikörpern die pFP2 Fusionspeptide. Sie sind nahezu rein und weitgehend frei von anderen Polypeptiden; dies ist ein weiterer Vorteil gegenüber pFP1 (vgl.in der Diskussion ein Argument für die effizientere Anreicherung). Die pFP2-Peptide können schon nach diesem Reinigungsschritt zur Immunisierung eingesetzt werden.

Wie in Abb.36 sichtbar, macht das pFP2-Peptid von Kodon f mehr als 50% der Masse *aller* Fusionspeptide aus. Dies steht im krassen Gegensatz zu den Massenverhältnissen der vier

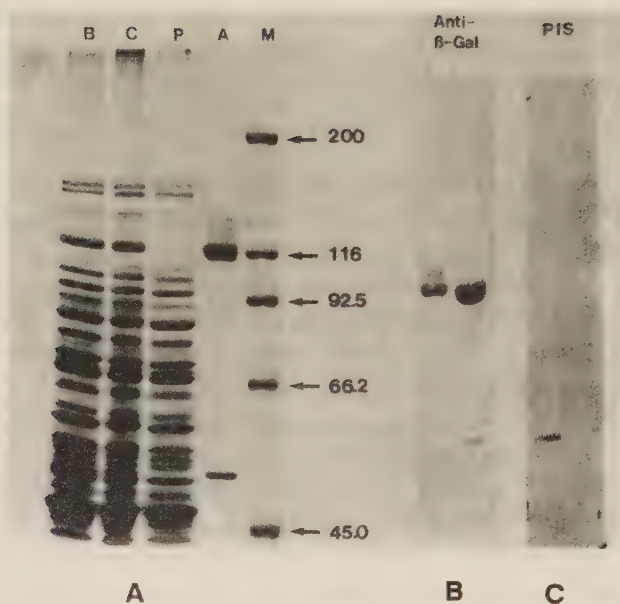


Abb.36A: Gelelektrophoretische Analyse von Aliquoten der präparativen Aufarbeitung von pFP2 (s.Text). B: Gesamte Bakterien nach U-Schal-Behandlung; C: Zytosolextrakt; P: Nichtgebundenes Protein in der pAPTG-Affinitätssäule; A: Aktivitätspool; M: Marker, die Zahlen geben das Molekulargewicht in kd an. B: Immunreaktion der Aktivitätsfraktion (erste Bahn) und β Galaktosidase (zweite Bahn) mit Anti- β Galaktosidase-Antiserum, nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western-Transfer. C: Wie unter B, Reaktion mit Präimmunserum.

pFP1-Peptide untereinander; hier war die Nettosynthese vom f-Peptid am schwächsten. In Hinblick auf eine noch effizientere Ausbeute wurde die prinzipielle Möglichkeit kontrolliert, ob sich die drei längeren Peptide präferentiell in der unlöslichen Fraktion befinden. Dazu wurde der gesamte bakterielle Proteinbestand nach Kochen in SDS auf seinen Polypeptidgehalt hin analysiert (Abb.36A, Bahn B). Die Massenverhältnisse sind jedoch auch hier ähnlich ungleich. Damit entsprechen die angezeigten Mengen in der Tat den Verhältnissen der gesamten intrazellulären Fließgleichgewicht-Konzentration.

V. TEIL: DAS C550-HUHNPROTEIN

19. Herstellung von Anti-C550-Antikörpern

Um Antikörper gegen das C550-Protein zu bekommen, wurden Kaninchen mit den gereinigten pFP2-Peptiden, wie in Materialien und Methoden angegeben, immunisiert. Um eine Immunantwort gegen möglichst viele antigene Determinanten auszulösen, wurden die pFP2-Peptide in einige Kaninchen in der β Galaktosidase-aktiven Form (nativ) und in andere nach vollständiger Denaturierung injiziert. Die Antikörperentwicklung wurde durch Immundiffusionstests nach (272) kontrolliert (nicht gezeigt). Die Immunisierung wurde beendet, nachdem die Reaktion der Seren mit den pFP2-Peptiden *mindestens* so stark war, wie mit β Galaktosidase selbst (s. Methode 30.). Um das Vorhandensein von C550-spezifischen Antikörpern im Anti-pFP2 Antiserum nachzuweisen, wurde ein Immundiffusionstest nach der in Abb.37 gezeigten Anordnung durchgeführt; erwartungsgemäß reagieren beide Antigene (β Galaktosidase und pFP2-Peptide) mit dem Antiserum, wie an den Präzipitationsbanden erkennbar ist. Die Reaktion zwischen Anti-pFP2 und pFP2 ergibt aber eine Bande mit einem vom Scheitel gerade weiterlaufenden "Sporn". Daher enthält das Anti-pFP2 Antiserum auch Antikörper, die mit pFP2, aber nicht mit β Galaktosidase reagieren. Diese Antikörper müssen offensichtlich den C550-Teil erkennen.

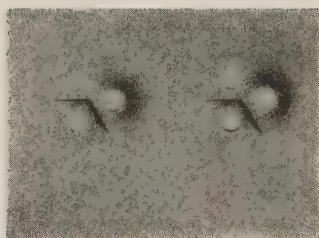


Abb.37: Immundiffusionstest zum Nachweis von spezifischen Anti-C550 Antikörpern. **Oben:** Ergebnis der Immundiffusion der Seren zweier Kaninchen, die mit "nativen" pFP2-Peptiden immunisiert wurden, gegen β Galaktosidase und pFP2-Peptiden; Gelfärbung mit Coomassie (nach Methode 30). **Unten:** Allgemeines Pipetierschema für den oben gezeigten Test; AFP2: Anti-pFP2 Antiserum; β G: β Galaktosidase; FP2: pFP2-Peptide; vgl.Text.

20. Nachweis des C550-Huhnproteins in Gewebeextrakten

Für die Entdeckung des natürlichen Huhnproteins wurden einige Organe aus Huhnembryonen präpariert und in Guanidinium-Hydrochlorid-Puffer homogenisiert. Ein Aliquot des Calvaria-Extraktes wurde (nach Entfernung vom Guanidinium, s.Methode 25.2) auch mit bakterieller Kollagenase behandelt. Der Proteingehalt der Homogenate wurde in einem PAA-Gel elektrophoretisch analysiert (s.Abb.38A). Genau die gleichen

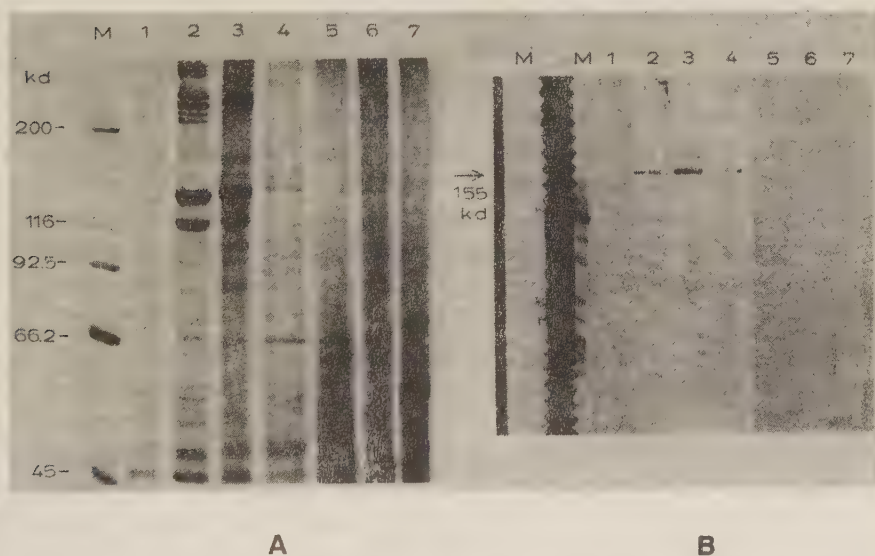


Abb.38A: Gelelektrophoretische Analyse von Huhn-Protein-extrakten. M: Marker; 1: wie 2, Kollagenase-behandelt; 2: Calvaria; 3: Sehnen; 4: Sterna; 5: Leber; 6: Herz; 7: Hirn. **B:** Immunreaktion der Polypeptide in A mit Anti-pFP2 Antiserum, nach Western-Transfer. M, 1 - 7: wie in A; die Marker-Bahn (M) wurde vor der Immunreaktion geteilt, und die linke Hälfte wurde mit Amidoschwarz gefärbt (s.Methode 33.).

Proteinmengen, die in Abb.38A gezeigt werden, wurden dann nach der Western-Blot-Technik (271) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Das C550-spezifische Anti-pFP2 Antiserum reagiert auf der Membran mit einem 155 kd-Protein in allen Geweben mesenchymalen Ursprungs (Calvaria, Sehnen, Sterna; s.Abb.38B, Bahnen: 2, 3, 4); dieses Protein ist dagegen in Leber, Herz und Hirn (Abb.38B, Bahnen: 5, 6, 7) (zumindest in den verwendeten Konzentrationen) nicht nachweisbar; und es kann mit Kollagenase nicht abgebaut werden (Abb.38B, Bahn: 1). Wenn die in Abb.38A gezeigten Proben vor der Elektrophorese nicht reduziert werden (nicht gezeigt; vgl.Methode 25.2), ergibt die Western-Blot-Analyse das gleiche Muster wie in Abb.38B. Dies bedeutet, daß das 155 kd-Polypeptid keine Disulfidbrücken enthält. Präimmuns-erum, bzw. Anti- β Galaktosidase Antiserum führen zu keiner Reaktion mit den Hühner-Homogenaten (nicht gezeigt).

Die hier dargestellten Eigenschaften des durch die C550-Antikörper entdeckten Proteins (Molekulargewicht, Kollagenase-Resistenz, Gewebe-Verteilung) sind mit den bekannten Eigenschaften der C550-RNA (Länge, Sequenz, gewebespezifische Expression) kompatibel. Somit scheint das 155 kd-Protein das gesuchte C550-Protein zu sein.

DISKUSSION

Das charakteristische Merkmal des Bindegewebes ist seine extrazelluläre Matrix, die eine Reihe von biologischen Funktionen erfüllt. Die Bindegewebsforschung hat in den letzten Jahren ihr Interesse naturgemäß auf die mengenmäßig überwiegenden Komponenten der Matrix konzentriert. In der Aufklärung der molekularen Struktur solcher Komponenten (Kollagene, Proteoglykane, Elastin, Laminin, Fibronectin) sind in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte erzielt worden. Von einigen Proteinkomponenten sind auch cDNA-Klone verfügbar und die Gene bekannt. Trotz dieser Fortschritte ist die physiologische Funktion und Regulation vieler Komponenten noch unklar. Man gewinnt außerdem zunehmend die Erkenntnis, daß weiteren Anteilen geringerer Häufigkeit eine wichtige Rolle bei der Organisation der Matrix und der Zell-Matrix Wechselwirkungen zukommt: Zellrezeptoren, Zell-Matrix-Mediator-moleküle und Elemente des Zytoskeletts scheinen ebenfalls entscheidend für die Gewebefunktion zu sein.

Die Methoden der Molekularbiologie erlauben einen Zugang zu Proteinkomponenten, deren direkte, proteinchemische Isolierung und Charakterisierung langwierig oder unmöglich sein würde. Aus einer derartigen experimentellen Konzeption stammt der Klon C550 (1), der als Ausgangspunkt für diese Arbeit diente; mit seiner Hilfe wurde ein Proteingen und seine Expression im Knorpel und anderen Bindegeweben des Huhns beschrieben. Im folgenden wird die biologische Signifikanz dieser Untersuchungen besprochen.

I. TEIL: ZUR EXPRESSIONSREGULATION VON C550

Am Beginn dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung C550 für den Knorpel und die Gewebsentwicklung des Huhns in der Embryonalphase hat. Alle Experimente in diesem Teil wurden mit Hilfe der S1 Nuklease durchgeführt (s.unten). Die erhaltenen Aussagen sind hier kurz zusammengefaßt:

- C550 ist eine genaue Kopie eines Bereichs von einer Huhn-RNA.
- Die Transkription verläuft - bezüglich der Restriktionsendonuklease-Stellen - in Richtung von Hin dIII nach Bam HI (s.Abb.4A).
- Die C550-RNA ist eine seltene RNA-Spezies.
- Die C550-Expression unterliegt einer gewebsspezifischen Regulation.
- Die C550-Expression kann auch von der zeitlichen Entwicklungsstufe des Gewebes abhängen.

1. cDNA/RNA-Kolinearität

Aus der Literatur sind Beispiele bekannt, bei denen Unterschiede zwischen cDNA und dazugehöriger RNA auftraten. Sie können das Ergebnis der verhältnismäßig hohen Fehlerquote der reversen Transkriptase sein, die (im Gegensatz zu den DNA-abhängigen DNA Polymerasen der Bakterien, s.(170)) keine "proof reading" Funktion besitzt (166);

außerdem kann die Verwendung der S1 Nuklease bei der cDNA-Konstruktion (168,169) oder auch DNA-Umlagerungen, die im bakteriellen Wirt erst stattfinden (163,165,169), solche Abnormalitäten verursachen. Obwohl die Komplementarität von C550 zu einer Huhn-RNA früher durch Northern-Blots gezeigt worden ist (1,2), läßt sich durch diese Methode verständlicherweise das Ausmaß der Homologie zwischen cDNA und RNA nicht feststellen. Geeignet ist in diesem Fall hingegen die Anwendung von S1 Nuklease. Durch diese Methode lassen sich DNA-Umlagerungen (163,165), kleine Insertionen und Deletionen (167,171) und auch Unterschiede in einzelnen Basenpaaren feststellen (167). Da nach dieser Methode das C550-Insert über seine ganze Länge vor S1 Nuklease von Huhn-RNA geschützt werden konnte, kann daraus geschlossen werden, daß es eine genaue Kopie einer Huhn-RNA-Region (aus Sterna-Gewebe) darstellt.

Die S1 Experimente wurden zuerst mit pC550-DNA durchgeführt, die nur an den Enden markiert, und später mit DNA wiederholt, die über ihre ganze Länge markiert war. Da in beiden Fällen gleiche Ergebnisse erhalten wurden, ist sicher, daß in den untersuchten RNA-Populationen keine weiteren, kürzeren RNA-Regionen mit Homologie zu C550 existieren.

2. Transkriptionsrichtung

Bedingt durch seine Konstruktion umfaßt C550 den polyA-Trakt der mRNA nicht. Deshalb ist die RNA-Polarität (bzw. der kodogene DNA-Strang) anhand der DNA-Sequenz (2) nicht erkennbar. Durch dieselben S1 Nuklease-Experimente ließ sich die RNA-Polarität feststellen. Die ermittelte Transkriptionsrichtung steht in Übereinstimmung mit dem einzigen offenen Leseraster der C550-Sequenz (s.später).

3. Häufigkeit der C550-RNA

Durch die S1 Nuklease-Methode wurde die Menge der C550-RNA in Sterna-Total-RNA bestimmt. Die S1 Nuklease-Experimente lieferten einen relativ niedrigen Wert für die Häufigkeit der C550-RNA, der $0.0123 \pm 0.0066 \%$ in Total-RNA beträgt, entsprechend ca. 0.1% der PolyA(+) RNA. Dieser Wert kommt der Häufigkeit z.B. der Präpro-enkephalin-RNA - also einer vergleichsweise seltenen RNA-Spezies - gleich (172). Ein Eindruck von der Bedeutung dieses Wertes für den Knorpel kann durch den Vergleich mit dem Literatur-Wert für die Kollagen Typ II-RNA in embryonalen Sterna vermittelt werden: Der Anteil dieser RNA, die das Hauptprotein in diesem Gewebe kodiert (40 - 50% des Trocken gewichts, s.(7d,68b)), ist in (173) nach einem ähnlichen Messungsprinzip mit 12% durchschnittlich in PolyA(+) RNA angegeben, was ca. 10 000 Kopien dieser RNA pro Chondrozyt entspricht. Unter der Voraussetzung, daß die C550-Expression in *allen* Chondrozyten gleich stark ist, würde dies in Analogie heißen, daß sich pro Chondrozytenzelle rund 100 Moleküle der C550-RNA befinden.

Es ist möglich, daß die S1 Nuklease wegen Fluktuationen der Sekundärstruktur des Hybrids endständige Nukleotide teilweise abspaltet, was hier einen geringeren Schutz der endmarkierten pC550-DNA vortäuschen würde. Dies scheint jedoch, bei den durchgeführten Experimenten kein besonders großes Gewicht gehabt zu haben: Die S1 Nuklease-Spaltung bei Temperaturen zwischen 10 - 45° C ergibt Werte, die im Bereich der statistischen Standardabweichung liegen (nicht gezeigt). Eine zuverlässigere Bestimmung der Häufigkeit kann gegebenenfalls mit Meßmethoden durchgeführt werden, die von anderen Autoren für RNAs in geringer Anzahl ausgearbeitet

worden sind (174).

Es stellte sich die Frage, wie es möglich war, eine der seltenen RNAs bei der cDNA-Konstruktion zu erfassen. Dies kann nur als Ergebnis der *dreifachen Selektion* der PolyA(+) RNA und RNA→cDNA-Kopien interpretiert werden, die zur Anreicherung anderer, häufigerer Spezies geführt haben mag (1,2):

- (1) **Längenfraktionierung** der Chondrozyten-RNA, die den Großteil kürzerer RNAs eliminierte.
- (2) **Reverse Transkription**; verschiedene Ursachen, wie z.B. Sekundärstruktur der RNA, können zu verminderter Effizienz der reversen Transkription führen (Ref.(175) und Referenzen dort). Wie von den RNase H Experimenten hergeleitet werden kann, ist für die Synthese des C550-Inserts ein relativ langer Bereich der mRNA (vom PolyA-Trakt mindestens $2.7 + 0.55 = 3.25$ kb) umgeschrieben worden. Dies weist daraufhin, daß die C550-RNA, verglichen mit anderen Spezies, anscheinend sehr effizient revers transkribiert werden konnte.
- (3) **Restriktionsendonuklease-Spaltung** der cDNA mit Bam HI und Hin dIII eliminierte schließlich von der Analyse alle cDNAs, die kein Fragment ergaben, das im erfaßten Molekulargewichtsbereich lag.

Auf Grund dieser Ausführungen läßt sich aussagen, daß wir im Besitz einer seltenen RNA-Spezies sind, die offensichtlich für keines der bekannten, in großen Mengen vorkommenden Knorpelproteine kodiert.

4. Regulierte Expression von C550

Die Quantifizierung des C550-RNA-Gehaltes in gleichen Mengen Total-RNA aus verschiedenen Huhn-Geweben deutet auf eine differenzielle Regulation der C550 RNA-Synthese hin. Die erhaltenen Werte sind unabhängig von der absoluten Anzahl der C550-Transkripte und reflektieren die realen Konzentrationsunterschiede der C550-RNA in den verschiedenen Geweben. Es wurde gezeigt, daß die Expression gewebespezifisch und entwicklungsabhängig ist. Am ausgeprägtesten ist der Unterschied in der Netto-Synthese zwischen Calvaria und Hirn (12 Tage alte Embryos) (relatives Verhältnis 10 : 1, entsprechend). Die dazwischenliegenden Werte der anderen Gewebe liefern ein komplexes Bild: Die Expression des Gens ist in einigen Geweben mesenchymalen Ursprungs relativ hoch (wie Sterna, Calvaria, Röhrenknochen). Dagegen zeigt Nicht-Bindegewebe, wie Leber und Hirn, eine geringere Expression. In Sterna bleibt die Expression konstant über acht Tage embryonaler Entwicklung, in Calvaria nimmt sie in der gleichen Zeit deutlich ab.

Interessanterweise ist die C550-Expression im Gelenkknorpel der Epiphyse reduziert. Ein entsprechender Sachverhalt wird beim Kollagen Typ X, (mit "umgekehrten Vorzeichen") angetroffen: Dieses Protein wird in hypertrophierendem Epiphyse-Knorpel synthetisiert ((89,90), vgl. Einleitung), nicht dagegen im hyalinen Sterna-Knorpel (91,176). Die C550-Verteilung könnte ein weiterer Hinweis für die Verschiedenheit dieser zwei Knorpelarten auf molekularer Ebene sein.

Die Netto-Synthese der C550-RNA wird also zweifellos in den Huhn-Geweben spezifisch gesteuert. Eine genaue funktionelle Bedeutung läßt sich daraus jedoch nicht ableiten. Es ist außerdem unbekannt, ob die geringe Expression in Leber und Hirn dem dort anwesenden Bindegewebe zuzu-

schreiben ist, oder ob das Parenchym bis zu einem gewissen Maße die C550-RNA exprimiert.

Die RNA-Regulation von C550 macht für das C550-Protein eine Funktion wahrscheinlich, die für die Erhaltung des Chondrozytenstatus mitverantwortlich ist. Es kann Strukturelement oder auch Regulatorprotein sein. Untersuchungen an weiteren Geweben und in weiteren Entwicklungsstadien, sowie auch Experimente zum Vergleich der C550-RNA-Mengen mit der RNA von "house keeping" Proteinen, sind sicherlich noch notwendig für die Bestätigung und genaue Aufklärung der Expressionsspezifität von C550.

Die ersten Untersuchungen des C550-Systems ließen also seine biologische Signifikanz in zweifacher Hinsicht erkennen:

- (1) Wegen der regulierten Expression ist C550 ein interessantes Objekt und attraktives Modell für das Studium der Physiologie des Differenzierungsprozesses im Bindegewebe.
- (2) Mit Hilfe von C550 ist es möglich, einen seltenen Bestandteil von spezialisierten Geweben zu erfassen, der sich einem direkten Zugang entziehen würde (vgl. Einleitung). Auf diese Weise wird zur Erforschung der biochemischen Zusammensetzung dieser Gewebe beigetragen.

Aus diesen Gründen wurde im weiteren die Charakterisierung des C550-Systems sowohl auf der Nukleinsäure- als auch auf der Proteinebene durchgeführt.

II. TEIL: ZUM GEN UND ZUR TRANSKRIPTION VON C550

5. Genstruktur

Die Menge der RNA in der Zelle wird durch die Transkriptionsrate und den RNA-Abbau bestimmt (217). Über die Regulation des "turn over" von RNA ist wenig bekannt (s.(217,218) und Referenzen dort). Dagegen sind große Fortschritte bei der Identifikation von Elementen gemacht worden, welche die Transkriptionseffizienz, und -regulation beeinflussen bzw. den Startpunkt bestimmen: Promotoren, enhancer, andere *cis*-Elemente (vgl.(219) und Ref.3 dort) und *trans*-wirkende Faktoren (220).

Um die Grundlage für die Analyse solcher Elemente im C550-System zu schaffen, wurde eine Genbank von Huhn-Calvaria-DNA konstruiert und daraus rekombinante λ Klone isoliert, die das C550-Gen enthalten. Die genomische Region wurde mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert und mit der Struktur von Klonen verglichen, die der Sterna-DNA entstammen (2). Es konnte durch diese Analyse ausgeschlossen werden, daß größere Strukturunterschiede in der DNA aus den zwei Quellen bestehen. Die Untersuchung mit weiteren Restriktionsendonukleasen, sowie DNA-Sequenzierung, wird bestätigen müssen, ob solche dennoch in der DNA-Feinstruktur zu finden sind (s.unten). Bislang sind also die Analysedaten von den Sterna-Klonen (2) auch für die Calvaria-Klone gültig.

Zusammen mit den in (2) beschriebenen Klonen konnten 28 kb genomischer Sequenz erfaßt werden. Schon frühe Ergebnisse (E.Pöschl, persönliche Mitteilung) mit Restriktionsendonukleasen, die tripelhelikale Abschnitte erkennen können (Sau 96I, Scr FI), zeigten, daß es sich hierbei nicht

um ein Kollagen-Gen handelt. Die Restriktionsendonuklease-Stellen sind statistisch über die ganze Region verteilt und es zeigt sich keine auffällige interne Sequenzrepetition. Der Vergleich der Genstruktur mit anderen Genen ergab keine Homologie (2).

6. Genlänge und mRNA-Bildung

Im Gegensatz zu der klassischen Definition des "Gens" als Komplementationseinheit (221) wird heute vielfach darunter der Begriff der "Transkriptionseinheit" verstanden. Um die Länge des Gens festzustellen, wurde durch Northern-Blot-Analyse untersucht, aus welchen Regionen C550-RNA synthetisiert wird. Wie es sich dabei herausstellte, erstreckt sich das C550-Gen über die ganze klonierte Region, die als seine Mindestlänge gelten muß (27 kb). Die Orte der Transkription-initiation und -termination sind also noch nicht genau lokalisiert und befinden sich möglicherweise *nicht* auf dem erfaßten Bereich.

Ein wichtiges Ergebnis war die Entdeckung, daß offensichtlich *zwei* stabile RNAs (mit 6.5 und 4.4 kb) transkribiert werden, die zu C550 komplementär sind. Da beide RNAs Sequenzhomologie zu der ganzen genomischen Region zeigen, sind sie splicing-Produkte von längeren primären Transkripten.

Für die Entstehung der *zwei* RNAs ist es im Prinzip möglich, daß diese jeweils von *zwei*, *verschiedenen*, homologen Loci transkribiert werden (vgl. nächsten Abschnitt). Alternativ kann ein gemeinsamer primärer Vorläufer von *einem* Locus differenziell prozessiert werden.

Differenzielles processing ist eine verbreitete

Erscheinung in der Genexpression der Eukaryoten (222). Die Transkription von vielen Genen führt zu zwei oder mehr verschieden langen RNAs. Dabei können die unterschiedlichen Bereiche an der 5'- (223-225) oder 3'-Region (226,227), oder auch zentral (228,229) lokalisiert sein. Da daraus nicht immer Unterschiede im *kodierenden* Bereich resultieren, ist die physiologische Konsequenz von differenziellem processing nicht immer klar.

Im C550-Fall konnten die Unterschiede der zwei RNAs auf ihrer 3' Region lokalisiert werden. Wenn die Transkription vom gleichen Locus erfolgt, bedeutet dies, daß die 5'-Enden der RNAs identisch sind. Die Bildung von unterschiedlichen 3'-Enden ist dann durch differenzielles splicing und/oder differenzielle Polyadenylierung möglich. Was tatsächlich zutrifft, kann *direkt* nur durch geeignete S1 Nuklease Experimente (s.in (171)), bzw. über cDNA-Konstruktion und Sequenzermittlung geklärt werden.

Indes erlaubt die Einbeziehung der C550-Proteindaten in die Analyse möglicherweise hier schon zwischen den zwei Alternativen zu unterscheiden: Da die Anti-C550 Antikörper nur ein einziges Protein zu erkennen vermögen (s.Resultate, 20.), muß die kodierende Sequenz der zwei RNAs gleich sein; differenzielles splicing könnte in diesem Fall nur die *nicht-kodierende* 3' Region betreffen. Interessanterweise ist aber differenzielles splicing nicht-kodierender 3' Regionen bis jetzt nur von einem einzigen Beispiel bekannt (MUP-Proteine der Maus, s. Ref. 224 in (222)). Deshalb erscheint als Ursache für die Ausbildung verschiedener 3' Termini der C550-RNAs *differenzielle Polyadenylierung* als wahrscheinlicher.

7. Genanzahl von C550

Im vorigen Abschnitt wurde das differenzielle processing unter dem Vorbehalt erörtert, daß die Transkription eventuell von mehr als einem Genlocus erfolgt. Einige Beobachtungen weisen nämlich daraufhin, daß die Möglichkeit mehrerer, homologer C550-Loci auf dem haploiden Genom in Betracht gezogen werden muß: Der genomische Bereich, der von der C550-cDNA überspannt wird, zeigt - verglichen mit dieser cDNA - Divergenz an mindestens drei Stellen (beschrieben in (2)):

- (1) Substitution von A durch G.
- (2) Substitution von einem TTTGTTT-Block durch einen AAAGAAA-Block.
- (3) Deletion vom Nonanukleotid ATTACATC.

Vorhandensein von nur einem Gen zwingt zur Annahme, daß Fehler bei der reversen Transkription passiert sind (vgl. (136,166)), die diese Unterschiede verursachten. Andererseits ist in dieser Arbeit die völlige Übereinstimmung von C550 mit der entsprechenden Region auf der mRNA hinlänglich demonstriert worden; bei zwei der Divergenzfällen handelt es sich um Unterschiede, die sowohl von der Qualität als auch von ihrer Lage auf C550 von der S1 Nuklease leicht erfaßt worden wären (167,171). Die weitere Alternative für diese Divergenz durch Veränderung der Phagen-DNA bei der Replikation in Bakterien ist recht unwahrscheinlich: die Fehlerrate der Polymerase für die A→G-Transition, bzw. für die T→A-Transversionen ist mit 2×10^{-7} bzw. 4×10^{-7} in (230) angegeben. Es wird hier also angenommen, daß die Unterschiede zwischen RNA (cDNA) und Genom-DNA real sind. In diesem Fall müßte die C550-cDNA letztlich Abschrift eines noch nicht identifizierten Gen-

locus sein. Für die Existenz von mehr als einem C550-Gen im haploiden Genom spricht außerdem die große Anzahl der isolierten genomischen Klone, die weit höher ist als man von statistischen Berechnungen her für ein Einzelkopie-Gen erwarten würde.

Bei gleichen Klonen aus beiden verwendeten Genbanken (diese Arbeit und (2)) wurde - soweit analysiert - ein uniformes Muster der Restriktionsendonuklease-Stellen und kein Sequenzpolymorphismus gefunden. Zusätzlich ist das Restriktionsmuster der äußersten genomischen Fragmente "eindeutig", was charakteristisch für Randfragmente von Einzelgenen ist. Diese Beobachtungen haben in (2) zu der Schlußfolgerung geführt, daß das C550-Gen nur einmal im haploiden Genom vorkommt. Der hohe Grad der Sequenzübereinstimmung von einigen homologen, nicht-allelischen Genen (z.B. den sehr ähnlichen ζ und $\psi\zeta$ Globingenen, s.(231)) demonstriert jedoch, daß die identische Restriktionsendonuklease-Karte eine Sequenzmikroheterogenität zwischen verschiedenen Klonen nicht ausschließen kann; und da die klonierte Region möglicherweise nicht das ganze Gen enthält, ist das Muster der Randfragmente eigentlich noch unbekannt.

Im übrigen sind alle bisherigen experimentellen Ergebnisse mit der Annahme mehrerer Gene kompatibel. Ob sie tatsächlich existieren, kann z.B. durch Analyse der Primärstruktur anderer genomischer Klonen von diesem Bereich überprüft werden.

Wenn die Hypothese der multiplen C550-Genen stimmt, kann die Transkription der zwei C550-RNAs auf zwei Wegen erfolgen: a) Beide werden von *einem* Locus transkribiert und differenziell prozessiert (wie im vorigen Abschnitt besprochen); in diesem Fall wären die übrigen Loci Pseudogenloci (s.(232)). b) Jede der zwei RNAs wird unabhängig voneinander von (mindestens) einem, nicht-allelischen, homologen Locus produziert.

8. "Chromosome-walking" und Telomeruntersuchung

Bedingt durch die bekannte Transkriptionsrichtung und Orientierung der cDNA auf dem Gen wurden der Promotor und die regulatorischen Elemente "links" von der erfaßten Region erwartet (vgl. Abb. 15). Die Isolierung von genomischen C550-Klonen aus der Calvaria-Genbank hat deshalb auch dem Vorhaben gedient, DNA-Bereiche zu erhalten, die bis dahin nicht kloniert worden waren. Interessanterweise enthielt keiner von 23 isolierten Klonen (diese Arbeit und (2)) neue Sequenzen. Somit scheint die äußerste Eco RI-Stelle (Abb. 15) eine physiologische Barriere der Klonierbarkeit von chromosomalen Bereichen dieser Region zu sein. Die Primärstruktur der DNA weist hier auch einige zusätzliche Besonderheiten auf (diese Arbeit und (2)): Einen sehr hohen GC-Gehalt (durchschnittlich 70 %, an einigen Stellen bis zu 90 %) und möglicherweise die Reiteration einer 100 bp Sequenz (in (2)). Diese Beobachtungen haben zur Hypothese geführt, daß es sich hierbei um eine besondere zelluläre Struktur handeln könnte, nämlich ein Telomer.

Telomerstrukturen sind aus mehreren Gründen interessant: Ihre DNA-Replikation ist z.B. eine besondere Aufgabe für die Zelle (210); das wird auch an den verschiedenen Mechanismen erkennbar, durch die die DNA von Viren mit linearem Genom repliziert wird (s. Referenzen 10, 14-18 in (211)). Obwohl auf Grund von experimentellen Beobachtungen (206, 211) einige Modellen des Mechanismus vorgeschlagen worden sind ((211, 212) und Referenzen 19-21, 45, 46 in (211)), ist der genaue Ablauf der eukaryotischen Telomerreplikation nicht bekannt. Die molekulare Untersuchung von Telomeren auf Nukleotidebene ist möglich, seit es gelungen ist, Telomere von niederen Eukaryoten zu klonieren (206). Sie haben eine

besondere Struktur mit sich wiederholenden Nukleotid-Blöcken und Einzelstrang-Brüchen (206,207). Auch die Annahme einer Z-DNA Konformation ist diskutiert worden (213). Bei der Variation von Oberflächenantigenen von Trypanosomen, ist der Austausch von Telomeren zwischen Chromosomen als ein möglicher Mechanismus der Genregulation erkannt worden (214).

Vor diesem Hintergrund erschien die Untersuchung attraktiv, ob C550 in der Nähe eines Telomers lokalisiert ist. Die Analyse mit Hilfe von Bal 31 ergab, daß sich C550 mindestens 22 kb weit entfernt von einem physiologischen DNA-Ende befinden muß; dies schließt die Lokalisierung in der Nähe einer besonderen DNA-Struktur nicht aus, macht jedoch ein Telomer als Kandidat für diese Struktur unwahrscheinlich. Gründe für die Unmöglichkeit, das erfaßte genomische Gebiet auszuweiten, können also hier tatsächlich

- die Abwesenheit einer Eco RI-Stelle auf einem langen Bereich, oder
- die schlechte Spaltbarkeit einer Eco RI-Stelle

sein. Unter der Voraussetzung, daß diese Region in Bakterien überhaupt klonierbar ist (vgl.(201,202) und Referenzen dort), sollte also hier DNA-Spaltung mit anderen Restriktionsendonukleasen zur Generation von Fragmenten die Klonierung dieser Bereiche ermöglichen.

III. TEIL: ZUR BAKTERIELLEN EXPRESSION VON C550

9. Bakterielle Expression von C550: Konzept

Die einzige sichere Quelle für Daten über das C550-Protein ist die DNA-Sequenz vom C550-Insert. Für die Ableitung der Aminosäuresequenz kommen natürlich nur diejenigen Leseraster in Betracht, die in Transkriptionsrichtung liegen. Da außerdem die C550 Region (0.55 kb) im *zentralen* Bereich von zwei viel längeren RNAs (4.4 und 6.5 kb) kartiert, sind darauf Start- und Endsignale für die Translation nicht zu erwarten. In Transkriptionrichtung besitzt C550 einen durchgehend offenen Leseraster (mit 182 Aminosäuren). Im zweiten Raster befinden sich nur zwei kurze Strecken, die für 32, bzw. 43 Aminosäuren kodieren würden und vom dritten Raster lassen sich nur sehr kurze Oligopeptide herleiten (2). Aus diesen Gründen kann nur der durchgehende Raster derjenige sein, der für ein Huhn-C550-Protein kodiert.

Für die Entdeckung des natürlichen Proteins sollte, ausgehend von der C550-DNA-Sequenz, ein Peptid synthetisiert und als Immunogen für die Produktion von Antikörper verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die Synthese dieses Peptids durch Übersetzung der *ganzen* C550-DNA Sequenz in Bakterien vorgenommen. Das 182-Aminosäuren-Fragment repräsentiert rund 15 % des natürlichen Proteins und es berechtigt zur Annahme, daß dagegen produzierte Antikörper auch das gesamte Huhnprotein spezifisch erkennen sollten.

Antikörper gegen natürliche Proteine können im Prinzip auch durch Immunisierung mit chemisch synthetisierten Oligopeptiden (10-20meren) produziert werden, deren Aminosäuresequenz aus der bekannten DNA-Sequenz abgeleitet wurde

(s.einschlägige Aufsätze in Ref.(273)). Trotz technischer Vorteile wurde dieser Weg hier nicht gewählt, weil eine *stärkere* Immunantwort mit dem langen, durch Bakterien erzeugten Peptid erwartet werden darf: Mit wachsender Peptidlänge wächst naturgemäß die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines günstigen Epitops darauf. Darüber hinaus entfalten immunogene Proteindeterminanten in ihrer natürlichen Umgebung ihre Wirkung vermutlich spezifischer.

Üblicherweise tritt bei der Expression fremder Gene in Bakterien, trotz der Universalität des genetischen Codes, eine Anzahl von Problemen auf (274): Im extremsten Fall kann das fremde Produkt letal für das Bakterium sein; die *Ausbeute* kann wegen unterschiedlichen Kodon-Gebrauchs und/oder Produktinstabilität (verstärkter Abbau) zu gering sein; die *Löslichkeit* des Produkts kann, obwohl mitunter vorteilhaft für die biochemische Trennung, zu Schwierigkeiten bei der weiteren Aufarbeitung führen; schließlich muß man über eine Methode zur Identifizierung (Nachweis der Expression) und *Isolierung* des Produkts verfügen. Trotz der Erfahrung aus ähnlichen Systemen läßt sich das Ergebnis der heterologen Expression nicht immer voraussagen.

Um einigen der oben angeführten Schwierigkeiten schon im voraus entgegenzuwirken, wurde C550 als kovalente Fusion mit β Galaktosidase exprimiert. Von der Fülle der Vektoren, die eine Fusion der C550-DNA mit *lacZ* erlauben, kamen diejenigen in Betracht, die mit einer großen Sicherheit zur *Translation* von C550 als *aktives* β Galaktosidase-Hybrid führen würden. Die Erhaltung der enzymatischen Funktion ist wegen folgender Aspekte vorteilhaft: sie erleichtert die Anreicherungskontrolle und sie ermöglicht die Isolierung auf *zwei* Wegen: sowohl über Liganden-Affinitäts- als auch Antikörper-Affinitätschromatographie.

Zuerst wurde C550 im Plasmid pUC9 (204) als Fusion mit *lacZ'* exprimiert. Um eine optimale Ausbeute zu erzielen,

wurde später das Plasmid pMC1871 (270) als Expressionsvektor benutzt; hier war C550 an der *gesamten* β Galaktosidase fusioniert. Obwohl erst der Vektor pMC1871 zu einer effizienten bakteriellen Expression geführt hat, war die ursprüngliche Konstruktion mit pUC9 in zweifacher Hinsicht sinnvoll und nützlich:

- (1) Das Plasmid pUC9 erlaubte die schnelle und leichte Konstruktion einer exprimierbaren Fusion (Plasmid pFP1) und eine wertvolle Detailanalyse der C550-Expression. Viele dieser Informationen sind auf das pMC1871-System (Plasmid pFP2) übertragbar. Sie machten eine zügige Analyse und Präparation des pFP2-Plasmids und der pFP2-Polypeptide möglich. Einige Ergebnisse der pFP2-Expression sind überhaupt nur durch die Vorarbeiten mit pFP1 eindeutig interpretierbar gewesen (vgl. z.B. die Translationsinitiation der Hybridproteine von internen, eukaryotischen Start-Kodons).
- (2) pUC9 (und verwandte Plasmide) ist in mancher Hinsicht ein attraktives Expressionssystem (vgl.unten). Ein Nachteil ist jedoch die Schwierigkeit, *lacZ'*-Fusionen im präparativen Maßstab herzustellen und zu isolieren (vgl.(254,276)). Am pFP1-Modell wurden die Möglichkeiten und die Limitationen von pUC9 als Expressionsvektor studiert, und einige Probleme konnten gelöst werden. Diese Arbeiten könnten also zu einer Weiterentwicklung des Systems als allgemeine Expressionsmethode beitragen.

Auf die Aspekte, die von allgemeinem Interesse für die Expression mit pUC9 sind, wird im Abschnitt 10.3 eingegangen.

10. C550-Expression in pUC9

10.1 pFPl Expressionsanalyse

Die Fusionierung von C550 an *lacZ'* wurde wie in Abb.23 gezeigt vorgenommen. Beim geschilderten Vorgehen mußte nur eine einzige DNA-Sequenz-Manipulation durchgeführt werden, um eine erfolgreiche Fusion im β Galaktosidase Raster zu erhalten - das Auffüllen des *Hin* dIII-Endes von C550. Da der Lac^+ Phänotyp der Bakterien mit pFPl zwar Translation des *lacZ'* Teils aber nicht notwendigerweise die erhoffte *Protein* fusion bedeutet, wurde letztere in mehreren Etappen nachgewiesen.

10.1.1 Nachweis der Transkription

Zuerst wurde ein einfacher Nachweis der Transkriptionskopplung durchgeführt: Wenn Transkription von pFPl vom *lac* Promotor gezeigt werden kann, muß die mRNA für die *lacZ'* Sequenz auch die C550-Sequenz beinhalten, die auf der DNA dazwischen liegt.

Die Transkription vom *lac* Promotor ist daraus ersichtlich, daß *lacZ'* Expression der negativen (*lacI*) und der positiven (Glukose) *lac* Operon Kontrolle unterliegt (277). Da die Demonstration der *lacI*-Repression auf X Gal-Platten nicht möglich ist (zu sensibler Test), wurde diese quantitativ durch Messung der β Galaktosidase Aktivität (ONPG-Hydrolyse, (266)) festgestellt.

In JM 103 (mit dem *lacI*^q Promotor) wird die *Lac*-Expression um das Zehnfache reduziert (von 300 auf 20 - 30 U, s.Abschnitt 13.2 der Resultate). Die Restaktivität ist darauf zurückzuführen, daß die Repressormoleküle, obwohl

10mal mehr als im Wildtyp (257), nicht ausreichen, um die *lac* Operatoren auf *allen* expressiven Plasmiden zu blockieren (vgl.(183)).

10.1.2 Nachweis der Translation

Die Fusion von C550 mit *lacZ'* auf Peptid-Ebene wurde durch zwei Methoden demonstriert: Zum einen durch Vergleich der phänotypischen Ausprägung gezielter pFP1 Mutationen, zum anderen durch direkte Visualisierung der Peptide im zellfreien Transkriptions/Translations-System.

Die Translationsanalyse lieferte ein unerwartetes Bild: Die C550-Sequenz stellt ein "hot spot" für Translationsinitiation dar, da mindestens vier interne Start-Kodons benutzt werden. Dies ist erstaunlich vor dem Hintergrund des *eukaryotischen* Ursprungs der C550-Sequenz. Auf dem 5'-nicht-translatierten Bereich prokaryotischer mRNAs wird die sogenannte Shine/Dalgarno-Sequenz gefunden, die als Ribosomenbindungsstelle fungiert (265). Die core-Struktur der Shine/Dalgarno-Sequenz, AGGA, befindet sich 16mal auf C550, viel öfter als statistisch erwartet (dies wäre einmal alle $4^4 = 256$ bp); sie liegt jedoch nicht im "richtigen" Abstand (3 - 9 bp, vgl.(265,278)) vor den funktionellen Startkodons. Obwohl diese Sequenz keine notwendige Voraussetzung für die Translationinitiation ist (s. z.B. *ci*-Repressor-Translation (279)), erhöht sie die Translations-Effizienz (278). Es scheint also, daß die (zufällige) Anhäufung von Ribosomenbindungsstellen auf C550 ihre ungünstige Positionierung kompensiert. C550 wird so zur "Ladefläche" für Ribosomen, die zu der multiplen Translationinitiation führen. Eventuell entstehen von weiteren Start-Kodons auf C550 Translations-Produkte, die hier nicht erfaßt werden können.

Es ist interessant festzustellen, daß mehrfache Translations-Initiation auf *einer* mRNA bei Prokaryonten die Regel ist (z.B. bei polycistronischen mRNAs), wohingegen bei den

mRNAs höherer Organismen ein eindeutiger Translations-Start gefunden wird (280). Anders ist es bei der *Transkription*: Bei Eukaryonten ist der Transkriptions-Start nicht immer genau festgelegt (virale Transkription (281-283) und Mikroheterogenität bei zellulären Genen (284-286)); der Initiationspunkt (und die Effizienz) der Transkription bei Bakterien wird dagegen von der "Pribnow-box" eindeutig definiert (287). Möglicherweise reflektiert diese Gesetzmäßigkeit eine grundsätzlich unterschiedliche Organisation in der Genexpression von Pro- und Eukaryonten.

Durch die Methode der in vitro Transkription/Translation konnte nicht gezeigt werden, daß ein Fusionspeptid entsteht, das vom *lac*-AUG translatiert wird. Da dies später in vivo sowohl bei pFP1, als auch pFP2 eindeutig gefunden wurde, kann dies nur an der in vitro Methode liegen. Bei in vitro Transkription/Translation von pBR322 war es ebenfalls unmöglich, das Protein für die Tetrazyklin-Resistenz nachzuweisen. Diese Schwierigkeit steht in Einklang mit Berichten anderer Autoren (288). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Konkurrenz für Gen-Expressions-Faktoren zwischen stark (β Lactamase) und schwächer (Tetrazyklin, pFP1) exprimierten Genen (259,289,290), in Kombination mit dem ungünstigen Kodon-Gebrauch der C550 Sequenz (s. später).

Es ist wichtig hervorzuheben, daß sich die genetische und die biochemische Analyse gegenseitig ergänzen. Ohne den biochemischen Nachweis blieben die genetischen Aussagen theoretische Möglichkeiten; und ohne den genetischen Hintergrund wäre das Bandenmuster der pFP1-Polypeptide schwer erklärbar.

10.2 Reinigung der *in vivo* synthetisierten pFP1-Peptide

Vor der Optimierung der Expression durch pFP2, wurde zuerst der Versuch unternommen, die pFP1-Peptide zu reinigen. Trotz der schwierigen Nachweises und Kontrolle ihrer präparativen Aufarbeitung ist es hier gelungen, die *lacZ'* Fusionen in wenigen Schritten frei von anderen bakteriellen Proteinen zu erhalten.

Für die Trennung wurde im ersten Schritt die enzymatische Funktion und im zweiten Schritt das große Molekulargewicht der Komplexe ausgenützt.

Zunächst wurden die aktiven Komplexe über eine pAPTG-Säule stark angereichert. Im Gegensatz zu Fusionen mit der gesamten β Galaktosidase war ihre Reinheit jedoch erheblich geringer (vgl.dazu (254)). Dies hat vermutlich folgenden Grund: Die geringe pFP1-Expression bedingt eine niedrige spezifische β Galaktosidase-Aktivität im bakteriellen Extrakt. An mehreren pAPTG-Liganten können so unverwandte Peptide binden, die die Aktivitätsfraktionen verunreinigen. Diese Fremdpeptide brauchen *nicht* β Galaktosidase-Aktivität zu besitzen: es ist bekannt, daß die Affinität von β Galaktosidase zu pAPTG nicht nur durch eine Enzym-Substrat-, sondern auch durch unspezifische, ionische Wechselwirkung zustande kommt (291). Je geringer die spezifische β Galaktosidase-Aktivität des bakteriellen Extraktes ist, desto stärker tritt die ionische Wechselwirkung vom Liganden mit unspezifischen Molekülen in den Vordergrund. Wie nach dieser Hypothese erwartet werden durfte, war die Reinheit der pFP2 Peptide - mit einer 10x höheren spezifischen Aktivität - ebenfalls höher.

Durch den zweiten Reinigungsschritt (nicht-denaturierende Elektrophorese) konnten die pFP1/M15 Komplexe von allen übrigen bakteriellen Proteinen getrennt werden. Die

Zusammensetzung der aktiven Komplexe wurde durch denaturierende Elektrophorese in der zweiten Dimension analysiert. So wurde festgestellt, daß in vivo alle postulierten pFP1-Peptide synthetisiert werden, und daß alle den M15-Akzeptor komplementieren können. Im Prinzip ist es also möglich, die Aktivitätskomplexe nach der nicht-denaturierenden Elektrophorese mit dem entsprechenden Gelbereich auszuschneiden, oder vorher zu eluieren und zur Immunisierung zu verwenden.

10.3 pUC9 als Expressionsvektor

Das pUC9 Plasmid wurde ursprünglich als Vektor für Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten entwickelt (204). Einige Eigenschaften, die pUC9 mit Vektoren teilt, die das gesamte *lacZ* Gen tragen, bieten sich auch für die *Expression* von klonierten Fragmenten an: Es stellt ein AUG-Startkodon zur Verfügung; und die Expression von *lacZ'*-Fusionen kann grundsätzlich mit dem *lacI* Repressor kontrolliert werden. Folgende pUC9-Eigenschaften könnten zusätzlich besonders vorteilhaft für die Expressionsklonierung sein:

- (1) Es besitzt eine große Anzahl von Restriktionsendonuklease-Stellen, welche die in vitro Rekombination, Orientierungsfestlegung, Rasteranpassung und weitere Manipulationen von klonierten Fremdsequenzen erleichtern. Die multiplen Restriktionsendonuklease-Stellen von pUC9 wurden in dieser Arbeit ausgiebig ausgenutzt. Die leichten DNA-Manipulationen am pUC9 stellen eine methodische Alternative gegenüber der Benutzung eigens dafür entwickelter Vektoren dar (292-294).
- (2) Gegenüber β Galaktosidase-Fusionen können *lac* α -Fusionen - da der Anteil des Trägerproteins geringer ist -

in einigen Punkten vorteilhafter für das Fremdprotein sein, z.B. für die Erhaltung seiner physiologischen Funktion (276), für eine spezifischere Immunisierung und eine leichtere proteinchemische Analyse (292).

Trotz dieser Aspekte konnte sich pUC9 nicht als allgemein verwendbares Expressionssystem durchsetzen, weil einige entscheidende Nachteile überwiegen:

- (1) Obwohl pUC9 und pUC9-Derivate in hoher Kopienzahl vorliegen (259), ist die Expression von *lacZ'* (183,259) und *lacZ'*-Fusionen (diese Arbeit und (254,276)) schwach; der Grund dafür ist nicht bekannt. Am wahrscheinlichsten erscheint, daß diese Peptide von der *lon*-Protease, die auch andere aberrante β Galaktosidase-Peptide erkennt, in einem Energie-abhängigen Prozeß abgebaut werden (s.(295) und Referenzen dort).
- (2) Auf Grund der geringen Netto-Synthese ist der Nachweis der exprimierten Peptide schwierig.
- (3) Bakterien mit pUC9 bzw. Derivaten können (auch unter Repressionsbedingungen in einem *lacI*^q Stamm) nicht auf/in glukosefreiem Minimalmedium wachsen (eigene, unpublizierte Ergebnisse). Wachstum in Minimalmedium wäre z.B. nötig für eine radioaktive Proteinmarkierung in vivo (Maxi-Zellen,(296)), oder für einen Maximierungsversuch der Expression (vgl.(297)).

Einige dieser Schwierigkeiten konnten am Modell der pFPl-Expression eliminiert, bzw. umgangen werden (s.oben). Das geschilderte methodische Vorgehen am pFPl-System dürfte auch bei der Expression von anderen *lac* α -Fusionen anwendbar sein:

- (1) Trotz der geringen Expression können die *lac* α -Fusionen durch pAPTG-Chromatographie und nicht-denaturierende

Elektrophorese rein erhalten werden. Eine Ausarbeitung der Reinigungsmethode für präparative Zwecke könnte die schwache bakterielle Produktion kompensieren.

- (2) Der Expressionsnachweis der Fusionspeptide in vivo kann durch zweidimensionale Elektrophorese ohne den Gebrauch von Antikörpern erbracht werden.
- (3) Für eine bessere Kontrolle des *lac* Promotors auf pUC9 und Derivaten wurde ein neuer Stamm konstruiert mit *lacZ* Δ M15 und *lacI* ^{q1} (Ergebnisse nicht gezeigt; für eine Beschreibung von *lacI* ^{q1} s. Referenzen in (257)). In diesem Stamm ist die *lacI*-vermittelte Repression von pUC9 und Derivaten vollständig, und das Wachstum in glukosefreiem Medium (mit Glyzerin) ist möglich.

Die Benutzung von pUC9 (und ähnlichen Plasmiden) als Expressionsvektor erscheint für *analytische* Zwecke allgemein möglich und sinnvoll. Da die Optimierung der Expression aber momentan noch nicht abgeschlossen ist, müssen für eine höhere Expression andere Vektoren verwendet werden. Dies wurde - in Anlehnung an ähnliche Arbeiten (254,276) - auch hier getan.

11. pFP2-Expression

Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der C550-Proteinanteil durch Fusion mit dem *gesamten* β Galaktosidase-Molekül stabilisiert (Konstruktion vom pFP2-Plasmid). Nachdem C550 schon in einem expressionsfähigen Zustand vorlag (pFP1), wurde nicht vom pC550-Plasmid sondern von pFP1 ausgegangen. Da der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonuklease-Stellen wie pUC9 (pSKS106, s.(270)) nicht zur Verfügung stand, wurde auf den ähnlichen Vektor pMC1871 (270) ausge-

wichen; dieser erforderte bei der Konstruktion der Fusion zusätzlich eine homologe Rekombination in vivo. Die Ligationsprodukte mußten daher in einen *recA*⁺ Stamm transformiert werden. Basierend auf der Information von pFP1 konnten die Anzahl und die Länge der pFP2-Peptide vorausgesagt werden. Genau diese vier Peptide konnten dann auch mit Anti- β Galaktosidase-Antikörpern nachgewiesen werden. Wiederum war also pFP1 Vorbedingung für die richtige Deutung der vier angereicherten pFP2-Banden, die ansonsten als Abbauprodukte des längsten pFP2 Peptids interpretiert worden wären. Auf der anderen Seite ist die erhoffte schnelle Verbesserung der Expression durch die pFP2 Konstruktion tatsächlich gelungen; dies wird an drei Punkten deutlich:

- (1) Die Ausbeute der Fusionspeptide, im Vergleich zu pFP1, ist um das 10fache gestiegen, was wahrscheinlich auf die größere Stabilisierung der C550 Teile zurückzuführen ist.
- (2) Auf Grund der erhöhten Expression konnte eine 10mal höhere spezifische β Galaktosidase-Aktivität des bakteriellen Extraktes erzielt werden, so daß der Aktivitätspool fast vollständig rein war. Eine weitere Optimierung der Reinigungsprozedur, wie z.B. in (298) beschrieben, war daher nicht erforderlichlich.
- (3) Die Identifizierung und ständige Anreicherungskontrolle der pFP2 Peptide ist durch Anti- β Galaktosidase-Antikörper leicht durchführbar (s.oben).

Die β Galaktosidase-Aktivität von pFP2 in CSH 50 betrug ca 700-1000 U (pro ml bei einer $OD_{600}=1$). Nach Transformation von pFP2 in F'11recA (260) erreichte sie ca. 3000 U. Es wurde nach einer Erklärung für diese gesteigerte Ausbeute gesucht. Da der Genotyp der zwei Stämme keinen Anlaß zur Annahme einer differenziellen *lac* Expression bietet, könnte der Grund hierfür die unterschiedliche pFP2-Matrizenzahl in

den zwei Stämmen sein. Um zu überprüfen, ob die primären CSH 50-Transformanten weniger pFP2-Moleküle enthalten, wurde die spontane Rekombinationsrate von pFP2-t zu pFP2 pro Zelle und Generation nach Auszählung der dunkelblauen Sektoren in hellblauen Kolonien berechnet (nach (299), s. Methode 36.); sie beträgt 1.36×10^{-8} . Obwohl also die homologe Rekombination bei einem pFP2-t Molekül durch X Gal Hydrolyse sichtbar wird, haben noch lange nicht alle pFP2-t Moleküle in einer CSH 50 Zelle (geschätzt auf ca. 20 Kopien, s. (182)) schon zu pFP2 rekombiniert. Reine pFP2 Moleküle werden jedoch in F'llrecA nach Transformation propagiert. Das heißt, daß die pFP2 Matrizenanzahl in F'llrecA viel größer ist.

Auffällig war die Beobachtung, daß erheblich mehr vom kürzesten Peptid als von den drei restlichen synthetisiert wurde. Die vorliegenden experimentellen Daten lassen nicht erkennen, ob diese ungleiche Verteilung einer ineffizienteren Translation und/oder einem bevorzugten Abbau der Peptide a, b, e von pFP2 zuzuschreiben ist. Es ist jedoch schwer einzusehen, wie ein proteolytischer Abbau nicht auch zu kürzeren Intermediärprodukten führt, sondern zum eindeutigen Muster der vier Peptide. Bemerkenswert sind hingegen die unterschiedlichen Kodons zwischen den drei längeren Fusionspeptiden a, b, e verglichen mit f: es fehlen zum Beispiel alle Kodons für Prolin, Valin, Alanin und Serin vom C550 Teil des f-Peptids. Sehr wichtig für die Translations-Effizienz könnte vor allem die ungleiche Verteilung der AAG Kodons (für Lysin) zwischen den Peptiden sein: Eine Anhäufung von 6 AAGs findet sich zwischen Kodons e und f: von AAG ist bekannt, daß es ungünstig für die Protein-Translation in Bakterien ist (im Gegensatz zu AAA) (300). Da für die Übersetzung aller drei Peptide a, b, e, nicht jedoch des Peptids f, Translation dieser 6 AACs nötig ist, könnte dieser gravierende Unterschied ausschlaggebend für eine ineffiziente Translation der drei längeren Peptide sein.

Für eine hohe Fremdproteinsynthese in Bakterien sind

viele Vektoren mit spezifischen Eigenschaften konstruiert worden: Plasmide, deren Kopiezahl durch "runaway"-Replikation erhöht werden kann (258,301), Plasmide mit starken Promotoren (*tac* Promotor (290,302)) oder solche, die eine Optimierung des Abstandes zwischen Ribosomenbindungsstelle und Starter-AUG erlauben (278). Obwohl eine eindrucksvolle Produktionssteigerung von seltenen Bakterienproteinen dadurch erzielt werden kann, sind diese Eigenschaften durchaus keine Garantie für den gleichen Erfolg bei der Expression *eukaryotischer* Gene in Bakterien: So kann z.B. die Expression des *lacI*-Repressors von 0.002% (266) auf 30% des zytosolischen Proteins gesteigert werden (303), eukaryotische Fusionen damit repräsentieren jedoch nur einen sehr geringen Anteil des bakteriellen Extraktes (304). Allein durch einen geeigneten Vektor lassen sich also nicht alle Barrieren der heterologen Expression, wie z.B. unterschiedlicher Kodon-Gebrauch, überwinden. Umsomehr ist bei der Vektorwahl Vorsicht geboten: Wäre z.B. in dieser Arbeit C550 an den C-Terminus der β Galaktosidase fusioniert worden (252), würde mit großer Wahrscheinlichkeit wegen der unüblichen C550-Kodons die Polypeptid-Synthese vorzeitig abbrechen, und die Mehrheit der isolierten β Galaktosidase-aktiven Moleküle würde in diesem Fall *keine* C550-Sequenzen enthalten.

IV. TEIL: ZUM C550-HUHNPROTEIN

12. Immunisierung mit pFP2 und Entdeckung des C550-Huhnproteins

Die pFP2 Peptide wurden zur Immunisierung eingesetzt, und in den gewonnenen Antiseren wurden Anti-C550-Antikörper nachgewiesen. Mit diesen Antikörpern wurde in rohen Huhn-Extrakten ein Protein mit folgenden Eigenschaften identifiziert:

- (1) Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 155 kd.
- (2) Das Protein enthält keine Disulfidbrücken und liegt daher wahrscheinlich als monomeres Polypeptid vor.
- (3) Das Protein enthält keine Kollagendomänen.
- (4) Die Expression des Proteins ist gewebespezifisch; es konnte in Knochen, Knorpel und Sehnen, nicht dagegen in Leber, Herz und Hirn nachgewiesen werden.

Anhand der eingeschlossenen Kontrollen und nach Berücksichtigung der mRNA-Daten konnte sichergestellt werden, daß dieses Protein das natürliche C550-Protein ist. Es sieht also so aus, daß *beide* C550-RNAs zu *einer* Proteinspezies führen; die physiologische Bedeutung von zwei RNAs mit gleicher Kodierungsinformation ist natürlich in diesem Stadium der Analyse noch völlig unbekannt.

Da die Expression der C550-RNAs mit der Chondrozyten-Differenzierung korreliert wurde (1), war interessant nachzuforschen, ob in der Literatur ein ähnliches Protein schon beschrieben wurde. Die Häufigkeit eines solchen

Proteins sollte in der Chondrozytenkultur mit zunehmender Dedifferenzierung abnehmen. Unter solchen "Chondrozyten-spezifischen Markern", die in einschlägigen Arbeiten definiert worden sind (78,120,121), befindet sich aber kein Polypeptid mit 155 kd. Wenn - simplifizierend - angenommen wird, daß die Translationsraten vom C550-Protein und vom Kollagen Typ II im embryonalen Knorpel gleich sind, kann man den C550-Proteinanteil auf Grund der bekannten RNA-Häufigkeiten berechnen (vgl. Diskussion, 3.): Er beträgt 0.5% der Trockenmasse. Höchstwahrscheinlich kann also eine differenzielle Expression einer solch geringen Komponente nicht mehr verfolgt werden.

Durch erste Immunfluoreszenzstudien, die nicht mehr in diese Arbeit aufgenommen worden sind, konnte das C550-Protein im intrazellulären Raum von Chondrozyten lokalisiert werden. Seine Verteilung ähnelt der von Komponenten des Zytoskeletts. Zytoskelettproteine sind am Prozeß der Dedifferenzierung aktiv beteiligt (66,125). Bestimmt ist es noch zu früh, um über die mögliche Identität und Funktion des Proteins zu spekulieren. Die Assoziation mit dem Zytoskelett könnte aber bedeuten, daß das Protein bei der Chondrozyten-Zellgestalt vor ihrer Dedifferenzierung mitwirkt. Da die Antikörper gegen pFP2 einen hohen Titer und eine starke Avidität und Spezifität besitzen, ist zu erwarten, daß weitere Studien zur vollständigen Isolierung und Charakterisierung des Proteins und zur Aufklärung seiner Funktion in Chondrozyten bzw. Knorpelgewebe führen werden.

MATERIALIEN UND METHODEN

PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN

Bemerkung: Im allgemeinen ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen in den jeweiligen Methoden angegeben. In Abschnitt hier werden nur Lösungen angeführt, die im Methodenteil entweder öfter erwähnt sind, oder deren Zusammenstellung Besonderheiten aufweist. Wenn nicht anders vermerkt, sind alle Angaben 1x- bzw. End-Konzentrationen.

- TE-Puffer: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA
- TBE-Puffer: 90 mM Tris-90 mM Borsäure, pH 8.3, 2.5 mM EDTA
- PBS-Puffer: 8.5 mM Na_2HPO_4 -1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl
- TMG-Puffer: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 10 mM MgSO_4 , 0.01% Gelatine
- NT-Puffer: 50 mM Tris-Cl, pH 7.8, 5 mM MgCl_2 , 10 mM β -Merkaptoäthanol
- S1 Nuklease Puffer: 30 mM Na-Azetat, pH 4.6, 0.3 M NaCl, 3 mM ZnSO_4 ; unmittelbar vor der Reaktion wurde ultrabeschallte E.coli DNA durch 10' Inkubation bei 95°C denaturiert und dem Ansatz mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt.
- SSC-Puffer: 15 mM Trinatrium-Citrat, pH 7.0, 150 mM NaCl
- B-Puffer: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl_2
- Z-Puffer: 60 mM Na_2HPO_4 -40 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -Merkaptoäthanol
- M9 Salze: 50 mM Na_2HPO_4 , 20 mM KH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 20 mM NH_4Cl
- Phosphatfreie M9 Salze: 20 mM KCl, 100 mM NaCl, 20 mM NH_4Cl
- Phenol (BRL) wurde mit 0.1% 8-Hydroxychinolin versetzt und mit TE-Puffer äquilibriert
- Phenol-Cresol: 500 g Phenol (BRL) wurde mit 55 ml TE-Puffer durch Rühren und Erwärmen gelöst.

Anschließend wurden dazu 70 ml m-Cresol und 0.6 g 8-Hydroxychinolin zugegeben.

- Chloroform: Mischung aus 24 Volumenteilen Chloroform und einem Teil i-Amylalkohol
- LB-Medium: 1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl
- LAM-Medium: wie LB + 10 mM $MgSO_4$
- LBM-Medium: 1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl, 10 mM $MgSO_4$
- LBM+DT-Medium: wie LBM + 0.01% jeweils Diaminopimelinsäure und Thymin
- Müller-Hinton-Broth und McConkey+Laktose-Medium (Letzteres für Agarplatten) waren fertige Produkte von Difco.
- Für Minimal- bzw. synthetische Medien (bzw. Agarplatten) wurde zuerst das Wasser (bzw. Wasser mit 1.5% Agar) autoklaviert und nach Abkühlen auf 50°C wurden die Zutaten dazupipettiert. Bei Agaroseplatten wurde ähnlich verfahren, wobei statt Agar 1% Agarose in Wasser autoklaviert wurde.
- Soft-Agar: wie LB-Medium + 0.5% Agar
- Minimal-Soft-Agar: 0.5% NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 0.5% Agar
- M-Agarose: 0.7% Agarose, 10 mM $MgSO_4$
- Ampizillin wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml für Platten und 100 µg/ml für Flüssigkulturen eingesetzt.
- Tetrazyklin-Endkonzentration: 10 µg/ml
- Streptomycin-Endkonzentration: 114 µg/ml
- X Gal (aufgelöst in Dimethylformamid): Endkonzentration 40 µg/ml
- IPTG-Endkonzentration: 0.5 mM
- Formamid wurde zur Reinigung 3x umkristallisiert.
- Glyoxal wurde zur Reinigung mit Amberlite deionisiert
- Radioaktive Nukleotide und Methionin (NEN bzw. Amersham) hatten folgende spezifische Aktivitäten:
 α - ^{32}P -dNTPs und γ - ^{32}P -ATP: ca. 3000 Ci/mmol;
 α - ^{35}S -dATP: ca. 500 Ci/mmol; ^{35}S -Methionin: ca. 1000 Ci/mmol.

GENOTYPEN

DP50^{supF}: F^- , *dapD8*, *lacY*, Δgal -*uvrB*, $\Delta thyA$, *nalA^r*, *hsdS*,
supE44, *supF58*
HB 101: F^- , *proA2*, *leu*, *thi*, *lacY1*, *str^r*, r_K^- , m_K^- , *endoI⁻*,
recA13
CSH 50: F^- , *ara*, Δlac -*pro*, *strA^r*, *thi*
 λ Charon 4A: *lac5*, *bio256*, *KH54*, *BW1*, *nin5*, *QSR80*, *Aam32*,
Bam1
BHB 2688: *N205*, *recA*, (λ *imm434*, *cIts*, *b2*, *red3*, *Eam15*,
Sam7)/ λ
BHB 2690: *N205*, *recA*, (λ *imm434*, *cIts*, *b2*, *red3*, *Dam15*,
Sam7)/ λ
C 600: F^- , *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, λ^-
JM 103: Δlac -*proAB*, *supE*, *thi*, *strA*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*,
(F' traD36, proA B', lacI^qZAM15)
JM 83: *ara*, Δlac -*proAB*, *strA*, *thi*, (ϕ 80d *lacZAM15*)
 $F'_{llr}recA$: Δlac -*proAB*, *thi*, *rifA*, *strA*, *recA*, ($F' lacI^{q1}Z^-$,
proA B')

MOLEKULARGEWICHTSMARKER

Molekulargewichtsmarker für DNA:

λ /Hin dIII: 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.6, 0.1 kb
 λ /Hin dIII + λ Charon 4A + λ Charon 4A/Eco RI: wie obiger
 Marker + noch folgendes: 45.4, 19.8, 10.9, 7.8, 6.9 kb
 ϕ X174/Hae III: 1353, 1078, 872, 603, 310, 271, 281, 234,
 194, 118, 72 bp
pBR322/Hpa II: 622, 527, 404, 309, 242, 238, 217, 201, 190,
 180, 2x160, 2x147, 122, 110, 90, 76, 67, 2x34, 2x26, 15,
 2x9 bp

Molekulargewichtsmarker für Proteine: Die Molekulargewichte
 der verwendeten Polypeptide werden je nach Bezugsquelle
 (Amersham, Biorad) mit kleineren Abweichungen angegeben (in
 kd):

Myosin: 200
 β Galaktosidase: 116
 Phosphorylase b: 94, 92.5
 BSA: 69, 67
 Ovalbumin: 46, 43
 Kohlensäure-Anhydrase: 30
 Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen: 20.1
 α Lactalbumin: 14.4
 Lysozym: 14.3

ALLGEMEINE METHODEN

1. Analyse von Makromolekülen durch Gelelektrophorese

1.1 Agarose/TBE (DNA)

Agarosegele mit TBE-Puffer (pH 8.3) wurden folgendermaßen präpariert: Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurde 0.4 - 2.5% (Gewicht/Volumen) Agarose (Seakem) im Puffer gekocht, auf eine horizontale Gelapparatur gegossen (Dicke der Agaroseschicht: in der Regel 0.3 cm) und erstarren gelassen. Das Gel wurde mit Puffer bis zu 0.3 cm über der Oberfläche bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit Auftragspuffer (5% Glyzerin, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 0.025% BPB, 0.025% XC) versetzt, 5' bei 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und aufgeladen. Die Elektrophorese war mit ca. 10 V/cm, oder mit einer geringeren Spannung für Läufe über Nacht. Die Gele wurden in TBE-Puffer + 2 µg/ml Ethidiumbromid für 10' gefärbt und unter UV-Bestrahlung photographiert. Wenn ein Autoradiogramm angefertigt werden sollte, wurden die Gele zuerst unter Vakuum und Hitze auf zwei 3MM-Papierlagen getrocknet.

1.2 Agarose/NaOH (DNA)

Die Analyse von DNA in Hinsicht auf Einzelstrang-Brüche (z.B. nach Fragment-Isolierung durch Trogelution, s.Methode 10.2) wurde mit Hilfe von alkalischen Gelen nach (177) durchgeführt: Die Agarose wurde zuerst in Wasser aufgeköcht, und nach Abkühlen auf 50°C wurde 1/10 Volumen vom 10x konzentrierten "Puffer" dazugemischt (Agarose-Endkonzentration: 1%; Ionenendkonzentration: 30 mM NaOH, 2 mM EDTA, gemessener pH-Wert: 12.7). Die Gelvorbereitung war wie in Methode 1.1. Die Proben wurden in dem (alkalischen) Auftragspuffer (2.5% Ficoll 400, 50 mM NaOH, 2 mM EDTA, 0.025% Brom-Cresol-Grün) aufgenommen und aufgeladen. Die Elektrophorese war mit 2.85 V/cm - z.B. bei einem Gel mit den Dimensionen 14 x 14 x 0.3 cm³: 40 V/120 mA für 12 Stunden. Die Gele wurden wie in Methode 1.1 (oder in 0.5 M Tris-Cl, pH 7.5, + 2 µg/ml Ethidiumbromid) gefärbt und, wenn nötig, exponiert.

1.3 Agarose/Hydroxymethylquecksilber (RNA)

Die Analyse von Total- bzw. PolyA(+) angereicherter-RNA, die nicht auf Gene-Screen transferiert werden sollte (vgl.Methode 23.4), wurde durch RNA-Auftrennung in einem

Agarosegel mit BSE-Puffer + Hydroxymethylquecksilber (als denaturierendes Agens, s.(178)) vorgenommen. Im Interesse einer möglichst geringen Kontamination der Geräte und Utensilien mit Quecksilber wurde eine spezielle Gelkammer benutzt; in dieser war es möglich, ein horizontales Gel mit vertikalen, "absteigenden" Agarosewänden zu gießen, welche den Kontakt des Gels mit dem Laufpuffer (BSE ohne Quecksilber) herstellten. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: 1% Agarose wurde in BSE-Puffer (50 mM Borsäure, 5 mM Na-Borat, 10 mM Dinatriumsulfat, 1 M EDTA, pH 8.0 mit NaOH) aufgeköcht, auf 50°C abgekühlt, und ein Teil davon wurde zum Gießen der vertikalen Wände verwendet; nach Erstarren der Wände wurde zum Rest Hydroxymethylquecksilber (Ventron) zu einer Endkonzentration von 6.2 mM dazupipettiert, und die Lösung wurde in den Horizontalteil der Kammer gegossen. Die Gelkammer wurde mit Puffer bis zum Kontakt mit den Vertikalteilen des Gels gefüllt, jedoch weit unterhalb der Oberfläche des Horizontalteils. Die RNA-Proben (nicht mehr als 10 µg/Bahn) wurden in den Auftragspuffer (10% Glyzerin, 0.5x BSE, 20 mM Hydroxymethylquecksilber, 0.025% BPB, 0.025% XC) aufgenommen, 1' bei 50°C erhitzt und sofort in die Geltaschen pipettiert, die vorher mit BSE aufgefüllt worden waren. Kurz nach Einwandern der Proben wurden die Taschen erneut mit BSE aufgefüllt, und, damit das Gel nicht austrocknete, wurde es für die Dauer der Elektrophorese mit Frischhaltefolie bedeckt. Die Bedingungen der Elektrophorese waren ca. 6 - 7 V/cm für 3 Stunden ohne Pufferzirkulation. Um die RNA sichtbar zu machen, wurden die Gele jeweils 2x 10' in 50 mM NaOH, 10 mM β -Merkaptoäthanol und 2x 10' in 0.2 M Kalium-Phosphat, pH 6.5, 10 mM Natrium-Jodoacetat, 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt; alternativ konnten die Gele auch durch 2x 15' Schwenken in 0.5 M Ammoniumacetat, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid, gefärbt werden (179). Die RNAs wurden unter UV-Licht photographiert.

1.4 PAA/TBE, nicht-denaturierend (DNA)

6 - 20%ige Polyakrylamid-Gele zur Auftrennung von DNA-Molekülen wurden wie folgt präpariert: Die nötige Menge Akrylamid + Bis (aus einer Stammlösung von 30% Akrylamid + 0.8% Bis in Wasser), TBE-Puffer und Wasser wurden gemischt und entgast. 0.1% frisch in Wasser aufgelöstes APS und 0.05% TMED (Endkonzentrationen) wurden dazugegeben, die Lösung wurde sofort in die vorbereitete Glasplattenvorrichtung gegossen und ein "Kamm" wurde hineingeschoben. Diese Vorrichtung bestand aus zwei aufeinanderliegenden Glasplatten, die an drei Kanten durch Kunststoff"spacer" (0.15 cm dick) voneinander getrennt und mit einer 0.5%iger Agaroselösung (in Wasser) abgedichtet worden waren. Nach der Polymerisation wurde der Kamm herausgezogen, und das Gel wurde vertikal an die Pufferkammern angeschlossen. Elektrophorese war zuerst für 15' ohne Proben (Vorlauf). Die Proben wurden in Auftragspuffer (s.Methode 1.1) aufgenommen, gegebenenfalls erhitzt, aufgeladen und mit bis zu 20 V/cm

elektrophoretisch getrennt. Färbung und Autoradiographie war wie in Methode 1.1, bzw. das Gel wurde vor der Autoradiographie nicht getrocknet, wenn Fragmente isoliert werden sollten (z.B. für DNA-Sequenzierung).

1.5 PAA/TBE, denaturierend (DNA-Sequenzgele)

20, 8 und 5%ige Sequenzgele (233) wurden für die Ermittlung der genomischen C550-Sequenz gegossen (vgl. Resultate, 6.5). Die Gelvorrichtung war wie in Methode 1.4; vor der Zusammenstellung wurde die Innenfläche einer der Platten mit 5% Dichlordimethylsilan in Chloroform behandelt; nur die unteren Glaskanten waren mit einem Streifen zur Abdichtung zugeklebt; die Gelabmessungen waren $40 \times 20 \times 0.035 \text{ cm}^3$, das 5%ige Gel war 80 cm lang. Die Vorgehensweise für die Präparation von jeweils 30 ml Lösung ist nachstehend erläutert; in Klammern stehen die Endkonzentrationen der Substanzen: 12.6 g Harnstoff (7 M) wurden mit dem entsprechenden Volumen einer 38% Akrylamid + 2% Bis-Lösung (für eine Endkonzentration des Monomers in 30 ml von eben 20, 8, bzw. 5%) unter Erwärmen aufgelöst und durch Rühren mit Amberlite deionisiert. Die Lösung wurde durch Whatmann No I filtriert, 3 ml 10xTBE Puffer und Wasser bis zum Volumen von 29.7 ml wurden dazupipettiert, und sie wurde entgast. 0.3 ml 10% APS (0.1%) wurden dazu gegeben; 3 ml wurden abgenommen, mit 5 μl TMED (0.17%) gemischt und zum Abdichten der Glasplatten zuerst gegossen. Der Rest wurde dann mit 15 μl TMED (0.05%) gemischt und gegossen. Vorlauf war immer für 15'. Elektrophorese war mit 50 V/cm; das BPB war beim 20%igen Gel 13 cm, beim 8%igen und beim 5%igen Gel bis zum unteren Rand gewandert. Die Platten wurden nach der Elektrophorese auseinandergeklappt, die Gele (auf der nicht behandelten Platte, s.oben) mit Frischhaltefolie bedeckt und bei -20°C exponiert.

Für die Analyse der pFP1-Sequenz wurde das LKB-System für Sequenzgele benutzt; dieses Vorgehen unterscheidet sich von der herkömmlichen Methode (wie sie oben beschrieben wurde) im wesentlichen dadurch, daß die Glasplatten während der Elektrophorese erhitzt werden; dies bewirkt eine gleichmäßige Wanderung der radioaktiven Banden ohne "smiling". Die Gelpräparation erfolgte auf folgende Weise: Die (vordere) thermostatisierte Glasplatte (55 cm) wurde mit 5% Dichlordimethylsilan in Trichloräthan bestrichen (was später die Ablösung des Gels ermöglichen sollte). Die zweite Platte wurde mit "Bind-Silan" (20 ml Äthanol + 0.6 ml Essigsäure + 60 μl Silane A-174, LKB) bestrichen, was die Adhäsion des Gels bewirkt; beide Platten wurden anschließend mit Äthanol gewischt. Die Thermostatisierungsplatte wurde leicht schräg gestellt und spacers (0.35 mm) an die zwei Vertikalseiten angebracht. Eine 6%ige Akrylamidlösung wurde wie oben beschrieben präpariert und gegossen, indem die zweite Glasplatte langsam an der ersten Platte entlang hinaufgeschoben wurde. Die zwei Platten wurden mit Klammern

aneinander befestigt, der Kamm wurde hineingeschoben, und das Gel polymerisieren gelassen. Elektrophorese war zuerst für 1 Stunde ohne Proben und, nach dem Auftragen, bis das BPB ca. 35 cm vom oberen Rand erreicht hatte mit 3000 V bei 65°C. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit der zweiten Platte abgenommen, 30' in 10%ige Essigsäure getaucht, anschließend bei 80°C getrocknet und wie oben beschrieben exponiert.

1.6 PAA/nach Laemmli, nicht-denaturierend (DNA, Proteine)

Nicht-denaturierende Disk-Elektrophorese war im wesentlichen wie in Methode 1.7 beschrieben mit folgenden Unterschieden: SDS im Gel, im Laufpuffer und im Auftragspuffer wurde weggelassen; das Glycerin im Untergel wurde durch Wasser ersetzt. Polypeptide wurden vor dem Auftragen nicht erhitzt, und der Lauf war bei 4°C. Nach der Elektrophorese wurden die Proteingele wie in Methode 1.7 beschrieben mit Coomassie bzw. folgendermaßen mit X Gal gefärbt: Die Gele wurden für 15' in Wasser und 2x 15' in Z-Puffer Äquilibriert. Anfärbung der Regionen mit β Galaktosidase-Aktivität erfolgte durch Schütteln der Gele in Z-Puffer + 0.1% X Gal bei RT (Farbentwicklung bei den verwendeten Mengen: gewöhnlich nach 10'). Die Reaktion wurde gestoppt durch Einlegen der Gele in 7%ige Essigsäure.

Das PAA-Gel mit den Produkten der Alu I-Partialsplaltung von pFP1 bzw. pFP1H⁻ (s.Methode 9.2) wurde nach dem Lauf wie in Methode 1.7 angegeben mit DMSO und PPO für die Autoradiographie behandelt.

1.7 PAA/nach Laemmli, denaturierend (Proteine)

Die Gelvorrichtung war wie in Methode 1.4 beschrieben. Für die Disk-Elektrophorese nach Laemmli (264) wurden ein "Unter"gel (Trenngel) und ein "Ober"gel (Sammegel) mit verschiedenen pH-Werten und Akrylamid-Konzentrationen gegossen; unten ist das Protokoll für 50 ml Untergel und 15 ml Obergel angegeben:

Untergel:

Menge	Stammlösung	Endkonzentration
12.7 - 0 ml	Wasser	(-)
11.7 - 25 ml	30% Akrylamid + 0.8% Bis (in Wasser)	7 - 15% Akrylamid 0.18 - 0.4% Bis
12.7 ml	1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	0.38 M
10 ml	50% Glycerin	10%
1.62 ml	0.2 M Na ₂ EDTA, pH 7.0	6.5 mM

entgasen (Wasserstrahlpumpe)

1 ml	10% SDS	0.2%
0.284 ml	10% APS (frisch)	0.057%
0.0365 ml	TMED	0.073%

m i s c h e n u n d g i e ß e n

Das Untergel wurde sofort nach dem Gießen mit einer ca. 1 cm dicken Schicht i-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation (30 - 60') wurde das i-Propanol abgegossen, die Gelvorrichtung an dieser Stelle mit Wasser gründlich gewaschen und mit 3MM-Papier abgetrocknet.

Obergel:

Menge	Stammlösung	Endkonzentration
10.1 ml	Wasser	(-)
2 ml	30% Akrylamid +	4% Akrylamid
	0.8% Bis (in Wasser)	0.1% Bis
1.9 ml	1 M Tris-Cl, pH 6.8	0.125 M
0.6 ml	0.2 M Na ₂ EDTA, pH 7.0	8 mM
0.01 ml	1% BPB *)	(-)

e n t g a s e n (W a s s e r s t r a h l p u m p e)

0.3 ml	10% SDS	0.2%
0.09 ml	10% APS (frisch)	0.06%
0.018 ml	TMED	0.12%

m i s c h e n u n d g i e ß e n a u f d a s O b e r g e l

*) BPB dient zur Kontraststeigerung der Geltaschen beim Aufladen der Proben.

Ein Kamm wurde in das Obergel hineingeschoben, so daß 1.5 - 2 cm Obergel zwischen den Taschen und dem Untergel ausgespart blieb. Nach der Polymerisation wurden der untere spacer und der Kamm entfernt, und die Taschen wurden mit Wasser gespült. Das Gel wurde an eine Elektrophoreseapparatur in vertikaler Lage befestigt, und die Kammern wurden mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, pH 8.3, 0.05% SDS) gefüllt. Blasen am unteren Gelrand wurden mit einer Kanüle entfernt. Die Proteinproben wurden in Auftragspuffer (5% Glycerin, 40 mM Tris-Cl, pH 6.8, 50 mM DTT - alternativ: 1.4 M β -Merkaptoäthanol - 1% SDS, 0.005% BPB) aufgenommen, 3 - 5' bei 95°C erhitzt, kurz abzentrifugiert (Eppendorf) und aufgetragen; für die Analyse von Proteinen ohne vorherige Reduktion (vgl. Resultate, 20.) wurde DTT, bzw. β -Merkaptoäthanol im Auftragspuffer weggelassen. Elektrophorese war bei RT, mit 25 mA konstanter Stromstärke, bzw. 25 mA für den Lauf der Proben im Obergel und bis zu 50 mA im Untergel (bei einem Gelquerschnitt von 2.4 cm), bis die Glyzinfrent (BPB) den unteren Gelrand erreicht hatte. Um die aufgetrennten Polypeptide sichtbar zu machen, wurde das Gel mit 0.062% Coomassie Brilliant Blue R-250

(Serva), 45% Methanol, 10% Essigsäure (in Wasser) für ca. 30' gefärbt und mit der gleichen Lösung ohne Coomassie bzw. mit 7% Essigsäure durch Schütteln entfärbt. Die Polypeptide wurden photographiert und das Gel zur Daueraubewahrung auf 3MM-Papier durch Hitze und Vacuum getrocknet.

Zur Autoradiographie von ^{35}S -markierten Molekülen wurden die PAA-Gele zuerst ebenfalls mit Coomassie gefärbt (s.oben), wodurch außer der Proteinfixation gleichzeitig eine Kontrolle des Gellaufs möglich war; Methanol-entfärbte Gele (s.oben) wurden anschließend für mindestens 15' in 7% Essigsäure geschwenkt. Die Gele wurden 2x 30' in ca. 250 ml DMSO dehydriert. Pro Gel wurden 25 g PPO mit 125 ml DMSO gelöst (Endvolumen: 150 ml), und die Gele wurden mit dieser Lösung für 2 Stunden geschüttelt. Nach dieser Behandlung wurden die Gele für 30' durch Schütteln in Wasser wieder hydriert, auf 3MM-Papier durch Hitze und Vacuum getrocknet und autoradiographiert. Durch die PPO-Behandlung wird eine Signalamplifikation der mit ^{35}S -markierten Moleküle etwa um den Faktor 10 erzielt (Daten nicht gezeigt).

1.8 2D-Gele (Proteine)

Zur Analyse der pFP1-Polypeptide in zwei Dimensionen (vgl.Resultate, 15.) wurden die Methoden 1.6 und 1.7 auf folgende Weise kombiniert: 25 μg β Galaktosidase-Äquivalente wurden zuerst wie in Methode 1.6 beschrieben in einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Nach der Färbung mit X Gal wurde der Gelstreifen ausgeschnitten und in Wasser (zur Entfernung von β -Merkaptoäthanol) 2x 15' geschüttelt. Anschließend wurde er 15' in 40 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% SDS, 10 mM EDTA bei RT äquilibriert (Erhitzen auf 65°C führte zu gleichen Ergebnissen). In der Zwischenzeit wurde ein denaturierendes PAA-Gel nach Methode 1.7 gegossen; bevor das Obergel polymerisiert war, wurde der Streifen horizontal und ein spacer (für den Molekulargewichtsmarker, s.Abb.32) hineingeschoben, sodaß zwischen ihnen und dem Trenngel 2 cm Abstand gelassen wurde. Nach der Polymerisation des Obergels wurde die Elektrophorese und die Färbung mit Coomassie wie in Methode 1.7 beschrieben vorgenommen. Durch diese Färbemethode konnten der M15-Akzeptor, einige Proteine, die im nicht-denaturierenden Gel schneller als die Komplexe wandern, und die Marker-Polypeptide sichtbar gemacht werden; um auch die pFP1-Polypeptide zu entdecken, wurde das Gel zuerst über Nacht durch Schwenken in 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt und dann mit Silber nach dem Protokoll und mit den Reagenzien im "Silver Stain Kit" von Biorad wie in der Tabelle angegeben gefärbt:

Zeit (Minuten)	Volumen (ml)	Reagenz
2x 30	400	10% Äthanol, 5% Essigsäure Oxidationslösung
10	200	
3x 10	400	Deionisiertes Wasser

30	200	Silber-Reagenz
2	400	Deionisiertes Wasser
1	200	Entwicklerlösung
5	200	Entwicklerlösung
(-)	400	7% Essigsäure (Stopp)

Eine weitere 5minütige Behandlung mit dem Entwickler (wie im Originalprotokoll angegeben) war nicht nötig. Von der verwendeten pFPl/M15 Komplex-Menge (s.oben) wurde geschätzt, daß (im Gel von Abb.32) pro pFPl-Bande höchstens etwa 1 µg Protein enthalten ist. Obwohl durch diese Methode die pFPl-Polypeptide deutlich dargestellt werden konnten, wurden der M15-Akzeptor, sowie einige Markerproteine, reproduzierbar nur schwach und nicht proportional zu ihrer Masse (verglichen mit der Coomassie-Färbung, s.oben) angefärbt.

2. Herstellung von DNase-freier RNase

Kommerzielle RNase A wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml Wasser aufgelöst, 15 Minuten lang bei 100°C gekocht und langsam auf RT abkühlen gelassen (179). Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

3. Radioaktivitätsmessung

Um radioaktive Proben zu quantifizieren, wurden sie in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (rotiszint, ROTH) eingetaucht (bei Flüssigkeiten: höchstens 1 ml Probe) und die Zerfälle pro Minute in einem β Counter 1 - 5' gezählt. Von wässrigen ^{32}P -markierten Proben wurde grundsätzlich die Cerenkow-Strahlung gemessen (ohne Szintillationsflüssigkeit); im genannten Counter konnten so ca. 50% der Zerfälle erfaßt werden.

4. Autoradiographie

Auf die Gele mit aufgetrennten, radioaktiv markierten Molekülen, wurde ein Röntgen-Film (gewöhnlich X-R 5, manchmal Ortho G von Kodak) daraufgelegt, die Gele wurden in eine lichtdichte Kassette eingeschlossen und bis zur zufriedenstellenden Intensität der Signale exponiert (üblicherweise über Nacht). Alle Expositionen, außer bei den Sequenzgelen (s.Methode 1.5), fanden mit einem screen intensifiziert bei -70°C statt.

5. Lyophilisierung

Die Proben wurden bei -80°C (Trockeneis-Äthanol-Bad) eingefroren und im Vacuum bei -60°C gefrieretrocknet.

6. Präparation von Dialyseschläuchen

Dialyseschläuche wurden in 10 mM Na_2EDTA , pH 7.5, für 15 Minuten gekocht, zweimal mit autoklaviertem, doppeldestilliertem Wasser gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

7. Silikonisierung von Glasgeräten

Glas wurde in eine 5%ige Dichlor-Dimethylsilan-Lösung in Chloroform getaucht und für 5 Minuten darin belassen. Anschließend wurde es mit doppeldestilliertem Wasser gründlich gewaschen und für 2 Stunden bei 200°C gebacken.

PRÄPARATION UND ANALYSE VON DNA

8. DNA-Extraktion

8.1 Extraktion hochmolekularer DNA aus Huhn-Calvaria

Hühnchenembryonen wurden nach 12, 16 bzw. 19 Tagen Brutzeit aus den Eiern geholt und dekapitiert. Die Schädeloberseite wurde von der Haut befreit und die Calvaria wurden mit einer Pinzette an der inneren Augenseite gegriffen und herausgeholt. Sie wurden in PBS gewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die DNA-Extraktion erfolgte im wesentlichen nach (234). Dazu wurden 10 Gramm Gewebe (entsprechend ca. 300 Calvaria) unter flüssigem Stickstoff mit einem ULTRA-TURAX Homogenisator vorsichtig pulverisiert. Schon pulverisierte Portionen wurden nacheinander zu 100 ml vorgewärmten Dissoziationspuffer (0.5 M Na_2EDTA , pH 8.0, 0.5% Sarkosyl, 300 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K und 100 $\mu\text{g/ml}$ DNase-freie RNase) in silikonisiertem Erlenmeyerkolben gegeben und bei 56°C mit 50 rpm geschüttelt. Nach ca. 3 Stunden wurde das noch nicht dissoziierte Gewebe 5' bei RT mit 2000 rpm abzentrifugiert, nochmal in 100 ml gleichem Puffer aufgenommen und für weitere 3 Stunden geschüttelt. Danach wurde der Zentrifugationsüberstand dazu-

gegeben und die gesamte Lösung (200 ml) wurde mit gleichem Volumen Phenol-Cresol (s.Puffer, Lösungen und Medien) extrahiert; dazu wurde die Lösung in 50-ml-Falcon-Röhrchen umgefüllt, Phenol-Cresol wurde dazupipettiert und die zwei Phasen wurden vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation (5', 2000 rpm) wurde die organische Phase abgezogen; die Phenol-Cresol-Extraktion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Am Schluß wurde die wässrige Lösung noch einmal mit Chloroform extrahiert. Zur Entfernung von Salzen wurde die Lösung zweimal gegen 10 l TE-Puffer für 24 Stunden dialysiert. Zur DNA-Lösung wurde noch 1 µg/ml DNase-freie RNase dazugegeben, und die DNA wurde bei 4°C aufbewahrt. Die extrahierte DNA-Menge betrug nach Messung der OD₂₆₀ und der Abschätzung vom Gelbild 15 mg, absolut (entsprechend 1.5 mg/g Gewebe).

8.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien

500 ml LB Medium wurden mit E.coli C 600-Glyzerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C, bis zur Sättigung mit 160 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden, wie in Methode 8.5 für die Plasmidisolierung beschrieben, gewaschen und lysiert. Zum Lysat wurde 0.1 mg/ml DNase-freie RNase gegeben und es wurde 1 Stunde, bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.3 mg/ml Proteinase K wurde die Lösung weitere 2 Stunden bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Proteine wurden durch Phenol zweimal extrahiert und die wässrige Lösung wurde gegen TE-Puffer, wie für die eukaryotische DNA beschrieben (s.Methode 8.1), dialysiert. 17 - 18 mg DNA wurden auf diese Weise isoliert und bei 4°C aufbewahrt. Diese DNA wurde hauptsächlich als "carrier" für Hybridisierungen und für Nucleinsäurespaltungen mit der S1 Nuklease eingesetzt.

8.3 Züchtung und DNA-Isolierung vom Phagenvektor λ Charon 4A

Die Züchtung von λ Charon 4A wurde mit E.coli DP50supF als Wirt vorgenommen (188). Dazu wurden zuerst 50 ml LBM+DT Medium mit DP50supF-Glyzerinsuspension angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 180 rpm bis zur Sättigung geschüttelt. Diese Tätigkeit, die vor jedem Großansatz auch für andere Stämme durchgeführt wurde, wird im folgenden allgemein durch die Formel "über Nacht Kultur" bezeichnet. Die DP50supF-über Nacht Kultur wurde abzentrifugiert (5', 4°C, 5000 rpm in der Zimmerzentrifuge) und mit 50 ml 10 mM MgSO₄ gewaschen. Das bakterielle Pellet wurde in 5 ml MgSO₄ resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt ("10xZellen"). Zur Phageninfektion wurden 2 ml 10xZellen mit 4x10⁷ pfu λ Charon 4A vereinigt und mit TMG-Puffer auf 4 ml aufgefüllt. Nach 10' bei 30°C wurde jeweils 1 ml der Suspension zu 500 ml LBM+DT Medium in Erlenmeyerkolben gegeben. Zu den Ansätzen wurde noch 5 mM

CaCl₂ pipettiert und die Kolben wurden 10' mit 40 rpm, und über Nacht mit 120 rpm, bei 32°C geschüttelt. Zu den lysierten Kulturen (OD₆₀₀ = ca. 0.6) wurden 5 ml Chloroform/500 ml gegeben und es wurde zur Vervollständigung der Lyse für 25' bei 37°C mit 150 rpm weiter geschüttelt. Die rohen Lysate (2 l) wurden vereinigt und jeweils 2 mg DNase I bzw. RNase A (SIGMA, Lyophilisat) wurden dazugegeben. Nach 1 Stunde bei 4°C wurde im Lysat durch leichtes Rühren 1 M NaCl gelöst (116.9 g/2 l), und von Bakterienresten durch Zentrifugation (20', 4°C, 9000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge) befreit. 10 ml vom Überstand wurden abgenommen, mit 0.01% Gelatine versetzt und bei 4°C aufbewahrt ("Stammlysat"). Frische Lysate enthalten ca. 5x10⁸ pfu/ml (s. Methode 12.4). Der restliche Überstand wurde mit 10% PEG 6000 versetzt und über Nacht, bei 4°C inkubiert. Es wurde zentrifugiert (20', 4°C, 9000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge) und das Phagenpellet in 10 ml TMG aufgenommen. Mit dieser Lösung wurde gleiches Volumen Chloroform gemischt, und nach Zentrifugation (10', 4°C, 6000 rpm in der Zimmerzentrifuge) wurde die obere (Phagen)phase abgetrennt. Der letztere Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zur wässrigen Phase wurden dann 0.77 g CsCl/ml (Ausgangskonzentration) gegeben (mittlere Dichte: ca. 1.5 g/ml), die Phagenlösung wurde in zuschmelzbare Zentrifugenröhrchen umgefüllt und mit dem VTi50-Rotor (Beckmann-Ultrazentrifuge) für mindestens 14 Stunden, bei 15°C mit 35000 rpm zentrifugiert (Zentrifugenauslauf: Ohne Bremse). Die Phagenbande in der Mitte der Röhrchen wurde mit einer Kanüle abgezupft.

Für die DNA-Isolierung wurde die Phagenlösung mit 1 mM EGTA (235) und 1 mg/ml Proteinase K versetzt und gegen 5 l TE+1 mM EGTA bei RT für 2 Stunden dialysiert. Das Dialysat wurde mit Phenol extrahiert, die Phagen-DNA mit Äthanol gefällt, in TE-Puffer in einer Konzentration von 0.5 bis 1 mg/ml aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ca. 500 µg Phagen-DNA/2 l Ausgangskultur.

8.4 Phagen-DNA Isolierung durch "Mini-Lyse"

Für die DNA-Analyse der rekombinanten Phagenklone wurde nur eine geringe Menge ihrer DNA nach der in (179) beschriebenen Methode isoliert. Dazu wurden etwa 10⁷ pfu mit 100 µl 10xZellen (s. Methode 8.3) vereinigt und 10' bei RT stehengelassen. Zu der Suspension wurden 3 ml M-Agarose (45°C) pipettiert, geschüttelt und auf LBM+DT Agarose gegossen und wie in Methode 12.4 beschrieben bebrütet. Unter diesen Bedingungen wachsen die Phagen bis zur Konfluenz der Plaques. Die Platten wurden für 2 Stunden kaltgestellt, danach jeweils mit 5 ml TMG überschichtet (Plattenfläche: 56 cm²), und für 3 Stunden bei RT horizontal geschüttelt. Die Pufferschicht wurde dann in Corex-Gläschen gegossen und 10', bei 4°C mit 8500 rpm zentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall). Zum Überstand wurden jeweils 10 µg/ml DNase I und

RNase A gegeben, und er wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dazu wurde anschließend das gleiche Volumen PEG-Mix (Ausgangskonzentrationen: 20% PEG 6000, 2 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 0.01% Gelatine) gegeben, die Lösung eine Stunde bei 0°C gehalten und 20', bei 4°C mit 11500 rpm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0.5 ml TMG aufgenommen und 2', bei 4°C mit 8500 rpm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Zum Überstand wurden 5 µl 10% SDS und 5 µl 0.5 M Na₂EDTA, pH 8.0, pipettiert. Die Lösung wurde 15', bei 68°C erhitzt, mit Phenol extrahiert, mit dem gleichen Volumen i-Propanol versetzt und 20', bei -80°C gehalten; danach wurde sie aufgetaut und 15', bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf). Das DNA-Präzipitat wurde mit 70% Ethanol in Wasser gewaschen und in TE aufgenommen. Die Ausbeute war ca. 10 µg DNA/Platte. Da sich diese DNA manchmal nicht mit Restriktionsendonukleasen spalten ließ, wurde sie zusätzlich über Elutip-d gereinigt.

Die ähnliche Methode der Phagen-DNA Isolierung aus flüssiger Kultur (179) wurde ebenfalls erfolgreich angewandt, allerdings mit einer 3 - 4x niedrigeren DNA-Ausbeute.

8.5 Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA

Über Nacht Kulturen der plasmidhaltigen Bakterienstämme wurden in LB Medium angefertigt. Das Medium enthielt zusätzlich 100 µg/ml Ampizillin (bei Bakterien mit pBR322, pUC9 bzw. Derivaten dieser Plasmide), 10 µg/ml Tetrazyklin (bei Bakterien mit pMC1871 bzw. Derivaten) und gegebenenfalls 114 µg/ml Streptomycin (für die Stämme: HB 101, CSH 50, JM 83, JM 103, F'llrecA). 10 ml dieser Vorkultur wurden in 1 l synthetisches M9 Medium (0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, M9 Salze, 0.4% Glukose, 0.5% Casaminosäuren, 10 µg/ml Thiamin) + die entsprechenden Antibiotika (s.oben) überimpft (180), und die Kultur wurde bei 37°C, mit 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀=0.1 geschüttelt. 2 mg/ml Uridin wurden dazugesetzt (181) und es wurde weiter geschüttelt bis zu einer OD₆₀₀=0.6. Zur selektiven Amplifikation der Plasmid-DNA wurden dann 100 µg/ml Chloramphenicol dazugegeben (182); obwohl diese Behandlung bei pUC9 und Derivaten nicht nötig ist (183), wurde sie trotzdem mit der Absicht durchgeführt, die Menge der chromosomalen DNA gering zu halten. Die Kultur wurde über Nacht weitergeschüttelt, und die Bakterien wurden dann in der Sorvall-Zentrifuge für 15', bei 4°C mit 5000 rpm präzipitiert. Das Pellet wurde in 15 ml CSB-Puffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 25% Saccharose) resuspendiert, in Polykarbonatröhrchen überführt und mit 1.5 mg/ml Lysozym (frisch gelöst in CSB) versetzt. Nach 2' auf Eis wurde 50 mM Na₂EDTA, pH 7.5, dazugegeben, und die Suspension wurde 10', bei 4°C langsam rotiert. 15 ml "Lytic-Mix" (25 mM Tris-Cl, pH 8.0, 8.25 mM EDTA, 2% Triton X-100) wurden zu den Bakterien pipettiert, und die Mischung weitere 20', bei 4°C rotiert. Bakterielle Reste und

der Großteil der chromosomalen DNA wurden durch Zentrifugation im 50.2Ti-Rotor (60', 4°C, 30000 rpm) entfernt. Der Überstand wurde mit 1 g CsCl und 10 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid pro ml versetzt (mittlere Dichte: 1.6 g/ml). Die Lösung wurde im VTi50-Rotor, für mindestens 36 Stunden, bei 20°C, mit 49000 rpm zentrifugiert (Beckmann-Ultrazentrifuge; Auslauf: ohne Bremse). Die untere Ethidiumbromid-gefärbte Bande wurde mit einer dicken Kanüle abgezapft und das Ethidiumbromid mit gleichem Volumen i-Propanol zweimal extrahiert. Das CsCl wurde durch Dialyse gegen TE-Puffer 2 Stunden, bei RT entfernt. Die DNA wurde mit Äthanol präzipitiert und in TE in einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen. Die Ausbeute betrug 2 - 3 mg/l Ausgangskultur.

8.6 Plasmid-DNA Isolierung durch "Mini-Lyse"

8.6.1 "Mini-Lyse" zur schnellen Analyse von rekombinanten Plasmiden

Diese Methode wurde für die schnellen Identifizierung von rekombinanten Plasmiden angewandt und auch immer dann, wenn die Analyse von superhelikalen DNA-Formen für den jeweiligen Zweck ausreichend war. Dazu wurde synthetisches M9 Medium (Zusammensetzung: s.Methode 8.5; hier war das Uridin (2 mg/ml) von Anfang an im Medium eingeschlossen) mit einzelnen Kolonien (zB. Transformanten) angeimpft und über Nacht bis zur Wachstumssättigung der Bakterien bei 37°C geschüttelt. 1 ml davon wurde abgenommen und im Eppendorfgefäß zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 1% SDS, 2 mM EDTA, 0.4 M Saccharose, 0.01% BPB aufgenommen und 10' bei RT auf einem Vibrator stark geschüttelt. Die Zellreste der auf diese Weise lysierten Bakterien und die Hauptmenge der chromosomalen DNA wurden 15', bei 4°C, in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Die superhelikalen Plasmidformen wurden elektrophoretisch (Agarose/TBE) analysiert (ca. 20 µl vom Überstand für jede Gelbahn); der Vergleich ihrer Migration mit dem Vektor (ohne Insert) ließ immer entscheiden, welche Plasmide als echte Rekombinanten in Frage kamen. Zur Entfernung von RNA, die mitisoliert wird, und die mit der DNA-Analyse interferieren kann, wurde im Gel 10 µg/ml RNase A eingeschlossen, die mit der Agarose zusammen gekocht wurde. Diese DNA ist nicht weiter spaltbar.

8.6.2 Isolierung von spaltbarer Plasmid DNA durch "Mini-Lyse"

Die hier beschriebene Methode ist eine Modifikation von (184). Die Anfertigung einer über Nacht Kultur erfolgte wie in Methode 8.6.1. 2 ml davon wurden abzentrifugiert und mit TE gewaschen. Das Pellet wurde in 0.4 ml CSB-ML (15% Saccharose, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5, 50 mM EDTA) aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt, und 0.1 ml frisches 5 mg/ml Lysozym (in CSB-ML) wurde dazugegeben. Nach

10minütiger Inkubation in Eis wurden 0.3 ml "Lytic-Mix"-ML (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5, 50 mM EDTA) hinzugefügt, der Ansatz gut durchmischt und weitere 10' auf Eis inkubiert. Es wurde 15', bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein zweites Eppendorf pipettiert. Die (meisten) Proteine wurden 15', bei 70°C denaturiert, der Ansatz wurde für die gleiche Zeit auf Eis belassen und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf transferiert, und 1 ml Äthanol wurde dazugegeben. Die DNA wurde 5', bei 4°C präzipitiert und in 100 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 µg/ml DNase-freie RNase aufgenommen. Nach 15', bei 37°C wurde zum Ansatz 100 µg/ml Proteinase K gegeben, und die Inkubation wurde für 30', bei 50°C fortgesetzt. Die Lösung wurde anschließend mit Phenol extrahiert, mit Äthanol noch einmal präzipitiert und in 100 µl TE aufgenommen. Die so isolierte Plasmid-DNA war frei von RNA und Proteinen (Nukleasen) und enthielt ca. 10% chromosomale DNA. Die Ausbeute variierte von Plasmid zu Plasmid; für die meisten Zwecke der Analyse und Präparation von Plasmiden war die Menge und die Reinheit dieser DNA ausreichend.

9. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

9.1 Vollständige Spaltungen

Die DNA-Menge für *analytische* Spaltungen wurde stets so gewählt, daß im Mittel 50 - 100 ng pro DNA-Bande enthalten waren. Die Enzyme (gekauft von: Biolabs, Boehringer bzw. BRL) wurden bis zu einem 5fachen Überschuß (entsprechend der Aktivitätsdefinition vom Hersteller) eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Konzentration des Glyzerins (worin die Enzyme geliefert werden) im Ansatz nicht 10% überstieg. Obwohl die DNA-Präparationen grundsätzlich frei von RNA waren, wurde manchmal 1 µg/ml DNase freie RNase A in die Ansätze eingeschlossen. Die Spaltungen wurden in einem Volumen von 10 bzw. 20 µl in Eppendorf-Gefäßen, für 1 - 2 Stunden bei 37°C in folgenden Puffern durchgeführt:

LOW-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 6 mM β-Merkaptoäthanol) für: Hpa II, (auch Cla I).

MEDIUM-Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 6 mM β-Merkaptoäthanol) für: Alu I, Ava I, Cla I, Hin cII, Hin dIII, Pvu II.

HIGH-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 6 mM β-Merkaptoäthanol) für: Bam HI, Eco RI, Pst I, Sal I, Sph I.

Für folgende Enzyme wurden Spezialpuffer verwendet:

Bgl II: 20 mM Glyzin-NaOH, pH 9.5, 10 mM $MgCl_2$, 7 mM β -Merkaptoäthanol

Sma I: 20 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT.

Xma I: 25 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM β -Merkaptoäthanol, 100 $\mu g/ml$ BSA.

Wenn es nötig war, die DNA mit mehreren Enzymen zu spalten, die unterschiedliche Bedingungen erfordern, wurde, wannimmer möglich, die DNA zuerst mit dem Enzym der niedrigeren Ionenstärke gespalten, das Enzym inaktiviert (10', bei 70°C), und - nach Berichtigung der Ionenstärke für das folgende Enzym - die Inkubation mit diesem fortgesetzt. Wenn dieser Schritt nicht möglich war (z.B. bei nötiger Veränderung des pH-Wertes), wurde die DNA vor der zweiten Inkubation mit Phenol extrahiert und mit Äthanol gefällt. Nach den Spaltungen wurden die Ansätze grundsätzlich in Agarose/TBE Gelelektrophorese (s.Methode 1.1) analysiert.

Präparative Spaltungen wurden grundsätzlich nach dem gleichen Muster durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, betrug die DNA-Konzentration nicht mehr als 0.4 mg/ml, und die Inkubationsdauer war für 4 - 6 Stunden. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch elektrophoretische Analyse eines Aliquotes überprüft, wobei der Hauptansatz während dieser Analyse bei -20°C gehalten wurde. Bei noch unvollständiger Spaltung wurde (gegebenenfalls nach erneuter Enzymzugabe) die Inkubation fortgesetzt. Nach Beendigung der Inkubation, wurde der Ansatz 10', bei 70°C erhitzt, und die DNA wurde, je nach weiterer Verwendung, entweder mit Auftragspuffer versetzt und direkt in einem präparativen Gel elektrophoretisch aufgetrennt, oder zuerst mit Phenol extrahiert und mit Äthanol gefällt.

9.2 Partielle Spaltungen

Für die Konstruktion der Genbank wurde die Calvaria-DNA partial gespalten; dazu wurden - ausgehend vom in (2) beschriebenen Pilotexperiment - 260 μg DNA mit 306 U Eco RI in 5 ml HIGH-Puffer für 42' bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und sofort 2x mit Phenol extrahiert und mit Äthanol präzipitiert. Die DNA wurde in 1.5 ml 0.3 M Natriumazetat, pH 7.0, aufgenommen, ein Aliquot davon wurde elektrophoretisch analysiert, und der Rest wurde noch einmal mit Äthanol präzipitiert. Das Pellet wurde dann in 0.6 ml HIGH-Puffer aufgenommen und, wie in Methode 10.1 beschrieben, über einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt.

Für die Alu I-Partialsplattung von pFP1 und pFP1H⁻ wurden jeweils 0.5 μg dieser Plasmide zuerst vollständig mit Eco RI gespalten und an der 3'-Ende mit α -³⁵S-dATP markiert (s.Methode 13.3). 2×10^5 cpm von jedem Plasmid (entsprechend

ca. 200 ng DNA) wurden zusammen mit jeweils 1 µg ungespaltenem pBR322 in 20 µl MEDIUM-Puffer mit 1 U Alu I bei 37°C inkubiert. Aliquote von 5 µl wurden nach 5', 10', 20' und 60' der Reaktion entnommen, in einem nicht-denaturierenden Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Methode 1.6; Akrylamid-Konzentration des Untergels: 10%) und durch Autoradiographie analysiert.

10. DNA-Fragment-Isolierungen

10.1 Über Saccharose-Gradienten

Für die Genbank-Konstruktion wurden die Huhn- und λ Charon 4A-DNAs über einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt (236): 260 µg partial gespaltene Huhn-DNA lag in 0.6 ml HIGH-Puffer vor (vgl. Methode 9.2); 165 µg des Vektors wurden mit Eco RI, wie in Methode 9.1 beschrieben, vollständig gespalten, gereinigt und ebenfalls in 0.4 ml HIGH-Puffer aufgenommen. Der Saccharose-Gradient (10 - 40%ig, in 20 mM Tris-Cl, pH 7.9, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA) wurde in SW 28 Zentrifugen-Röhrchen gegossen, die DNAs wurden 15', bei 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, und jeweils 0.2 ml/Röhrchen wurden vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Die DNAs wurden jeweils für 24 Stunden, mit 27000 rpm, im SW 28-Rotor zentrifugiert (Beckmann-UZ, langsame Beschleunigung, Auslauf: ohne Bremse); die Temperatur war bei der Huhn-DNA 20, bei der Vektor-DNA 4°C. Die Gradienten wurden durch Hineinpumpen von unten einer 50%iger Saccharoselösung (im obigen Puffer) unter automatischer Messung der optischen Dichte bei 260 nm in 0.6 ml Portionen fraktioniert. 30 µl-Aliquote einiger Fraktionen wurden in einem 0.5%igen Agarosegel (TBE) elektrophoretisch analysiert (vgl. Abb. 9B). Fraktionen mit Huhn-DNA der Länge 15-22 kb (in Abb. 9B Fraktionen-Nr.: 38-42) wurden vereinigt, 2x mit Äthanol gefällt, und in TE aufgenommen. Bei den Gradienten mit der Vektor-DNA wurden die Fraktionen mit den "inneren" Fragmenten (die zwei ersten peaks) und mit den Vektor-Armen (die drei letzten peaks) getrennt vereinigt, ebenfalls 2x mit Äthanol gefällt und in TE aufgenommen. Aliquote der DNA-pools wurden elektrophoretisch (Agarose/TBE) analysiert; da die Reinheit der Arme noch nicht zufriedenstellend war, wurden diese, nach Aufnahme in HIGH-Puffer, noch einmal über einen Saccharose-Gradienten gereinigt.

Diese DNA-Trennung wurde mit dem Saccharose-Gradienten durchgeführt, da die aus Agarosegelen isolierten DNA-Fragmente häufig nicht ligierbar waren (vgl. dazu Methode 10.2).

10.2 Durch elektrophoretische Elution

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden gewöhnlich im Gel aufgetrennt, identifiziert und nach folgenden Alternativmethoden vom Gel mit TBE-Puffer elektrophoretisch eluiert:

Die radioaktiven Xma I-Pvu II-Fragmente wurden durch Autoradiographie identifiziert (vgl. Methode 1.4); die entsprechenden Streifen vom PAA-Gel wurden knapp ausgeschnitten und in Dialyseschläuche mit ca. 1 - 2 ml Puffer transferiert. Die Schläuche wurden in eine Kammer mit Puffer - senkrecht zum Stromfluß - getaucht; Elektrophorese war für ca. 3 Stunden mit etwa 15 mA pro cm² Pufferquerschnitt. Es wurde für 30 sec umgepolt, die Schläuche wurden geöffnet, und das Eluat wurde abgenommen. Gelstreifen und Dialyseschläuche wurden mit 0.3 ml Puffer gewaschen, was ebenfalls zum Eluat gegeben wurde.

Das Pvu II-Fragment von pFPI wurde aus Agarose mit Hilfe von Biotrap (Schleicher und Schuell) isoliert (vgl. Methode 12.10): Die Biotrap-Zelle wurde nach dem Protokoll vom Hersteller aufgebaut (Elutionsfalle an der Anode, zwischen Membranen BT2 und BT1, letztere in der "richtigen" Orientierung); die Gelapparatur, worin Biotrap lag, war so abgedichtet, daß der Strom nur durch die Zelle fließen konnte. Nach Anfärben des Agarosegels mit Ethidiumbromid wurde die 838 bp lange DNA-Bande unter UV-Licht (304 nm) schnell ausgeschnitten, etwas zerkleinert und in die Elutionskammer von Biotrap gelegt. Die Elektrophorese war, nach den Empfehlungen des Herstellers, 10 V/cm für ca. 4 Stunden; es wurde für 10 sec umgepolt, das Eluat wurde mit einer Pipette in der Elutionsfalle etwas vermischt und dann abgenommen (ca. 300 µl).

Die effizienteste Methode zur Fragmentisolierung war die sogenannte "Trogelution": Präparative, horizontale Agarosegele wurden auf einer Quarzplatte präpariert; DNA-Elektrophorese (s. Methode 1.1) war in Gegenwart von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid im Gel und Puffer, wodurch die Fragmentwanderung - durch Bestrahlung von unten mit UV-Licht (304 nm) - während der ganzen Prozedur immer wieder verfolgt werden konnte; wenn das erwünschte Fragment eine gute Trennung von den anderen erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, der Puffer wurde bis ca. 2 mm unter der Geloberfläche abgenommen, und ein Trog (ca. 4 mm breit) wurde unmittelbar vor dem Fragment (in Anodenrichtung) im Gel ausgeschnitten. Eine einschichtige Dialysemembran wurde in den Trog so angebracht, daß sie an drei Vertikalwände durch Adhäsionskräfte festklebte und unter der Gelregion des Fragmentes (in Kathodenrichtung) lag. Der innere Trograum wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und das Fragment in den Trog elektrophoretisch eluiert; seine Wanderung in die gegenüberliegende Agarosewand wurde durch die Dialysemembran verhindert. Nach vollständiger Elution wurde das Gel

umgepolt, bis sich die DNA deutlich von der Membran abgelöst hatte (ca. 30 sec). Das Eluat wurde anschließend mit einer Eppendorf-Spitze vom Trog abpipettiert. Nach dieser Methode wurden das eukaryotische Hin dIII-Bam HI-Fragment von pC550 (vgl. Methode 22.2) und alle Fragmente isoliert, die nicktranslatiert werden sollten. Obwohl die Fragmenttrennung nach dieser Methode optisch immer perfekt war, waren im Eluat immer noch Spuren von anderen Fragmenten (z.B. vom Vektor pUC9) vorhanden, die nach Nick-Translation, bzw. Hybridisierungen sichtbar wurden. Die Methode konnte bedenkenlos für kürzere Fragmente (eben bis zu ca. 500 - 600 bp) angewendet werden; längere Fragmente bekamen auf Grund der UV-Bestrahlung unvermeidlich Einzelstrangbrüche, wie durch Analyse in alkalischen Gelen (s. Methode 1.2) gezeigt werden konnte.

Die Eluate konnten nach Bedarf (z.B. bei niedrigen DNA-Konzentrationen) durch i-Butanol-Extraktion bis auf 1/10 des Volumens reduziert werden, wobei gleichzeitig auch das Ethidiumbromid von der DNA entfernt wurde (179): Gleiches Volumen i-Butanol wurde zu der DNA-Lösung gegeben, mit dem Vortex gut gemischt und 1' abzentrifugiert (Eppendorf); die obere, organische Phase wurde abpipettiert und die Extraktion auf diese Weise 5 - 10x wiederholt, bis die wässrige Phase das gewünschte Volumen erreicht hatte. Durch Messung der radioaktiven Fragmente konnte sichergestellt werden, daß diese Methode verlustfrei ablief. Die DNA wurde anschließend mit Phenol extrahiert und mit Äthanol gefällt. Fragmente, die aus Agarose eluiert worden waren, wurden vor der Äthanol fällung zusätzlich über Elutip gereinigt. Die Ausbeute der Fragmentisolierungen durch elektrophoretische Elution wurde durch Radioaktivitätsmessung, optische Dichte bzw. Gelenanalyse festgestellt; sie lag zwischen 60 - 90%. Die Wahl der Elutionsmethode bestimmte nicht die Ausbeute, sondern die weitere Verwendung des Fragmentes.

11. Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden mit CIP

Lineare DNA wurde mit Äthanol gefällt und in 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, aufgenommen. 2 U CIP (Boehringer) pro 50 pmol DNA-Enden wurden dazugegeben (4facher Überschuß), und die DNA wurde 30', bei 37°C inkubiert (Endvolumen: 50 bzw. 100 µl). Die Reaktion wurde mit 10 mM NTA und 45' Inkubation bei 65°C gestoppt. Die Lösung wurde mit Phenol extrahiert, die DNA mit Äthanol gefällt und in TE (meist in der ursprünglichen Konzentration) aufgenommen. Die Entfernung der entstandenen Phosphate wurde durch einen Ligierbarkeitstest der DNA mit sich selbst kontrolliert. 100%ige Dephosphorylierung wurde mit dieser Methode erreicht. Obwohl gleich gute Ergebnisse mit BAP erzielt werden konnten (s. z.B. Methode 12.3), wurde CIP wegen der Möglichkeit der Hitzeinaktivierung bevorzugt.

12. DNA-Rekombination *in vitro* und begleitende Methoden

12.1 Präparation des Phagen-Verpackungs-Extraktes

Der Verpackungsextrakt wurde nach (237) angefertigt. Die Lysogene BHB 2688 und BHB 2690 wurden auf LAM-Agarplatten mit einer sterilen Öse ausgestrichen und über Nacht bei 32°C bebrütet. Jeweils eine Einzelkolonie von jedem Stamm wurde nochmal auf zwei Platten ausgestrichen, die bei 32, bzw. 42°C inkubiert wurden. Wenn auf den Platten bei 42°C keine Bakterien gewachsen waren, wurde mit den Platten bei 32°C weiter gearbeitet. Zu jeder davon wurden 5 ml LB-Medium pipettiert, und die Kolonien wurden mit einem sterilen Schaber abgekratzt. Jeweils 300 ml LB-Medium wurden mit 0.5 - 1 ml von jedem der zwei Stämme angeimpft, so daß die Initial-OD₆₀₀ = 0.05 bis 0.1 war. Die Kulturen wurden bei 32°C, mit 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0.3 geschüttelt. Die Produktion von Virion-Proteinen wurde dann durch Inkubation bei 45°C, für 25' induziert. Anschließend wurden die Bakterien 3 Stunden, bei 37°C mit 150 rpm geschüttelt und dann kaltgestellt. Ab hier wurde alles im Kühlen (4°C) durchgeführt. 1 ml wurde abgenommen, einige Tropfen Chloroform wurde dazugegeben und die Suspension nach 5' kontrolliert: Erfolgreiche Induktion führte zu Bakterienlyse. Beide Kulturen wurden dann vereinigt und 10', bei 4°C, mit 5000 rpm (Sorvall) zentrifugiert. Sie wurden mit 500 ml M9 Medium+Glukose (0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, M9-Salze, 0.4% Glukose) resuspendiert und in 80 ml Aliquoten in Petrischalen für 8', mit einer UV-Leuchtröhre im Abstand von 50 cm bestrahlt. Sie wurden wie oben zentrifugiert, in 10 ml Verpackungs-Puffer (40 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM Spermidin, 10 mM Putreszin, 0.1% β -Merkaptoäthanol, 7% DMSO) aufgenommen und noch einmal für 5', bei 4°C, mit 5000 rpm (Zimmerzentrifuge) präzipitiert. Das Pellet wurde schließlich in 300 - 500 μ l Verpackungs-Puffer aufgenommen, es wurde 0.1 ml 0.1 M ATP dazugegeben, und das Volumen wurde mit Verpackungs-Puffer auf 2 ml aufgefüllt (ATP-Endkonzentration: 5 mM). Die Bakterien wurden dann in 20 μ l-Aliquoten in Eppendorf-Gefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort aufbewahrt. Die Verpackungseffizienz solcher Extrakte war 1 - 5x10⁷ pfu/ μ g λ Charon 4A. Der Prophagen-bedingte Hintergrund war 0 - 10 pfu/Verpackungsreaktion (2x20 μ l Extrakt, s.Methode 12.3).

12.2 DNA-Ligationen

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Ligationen wurden mit T4 DNA-Ligase durchgeführt; wenn nicht anders vermerkt, wurden jeweils 400 U Biolabs- bzw. 6 U Boehringer-Ligase (anders definiert) eingesetzt; die Reaktion war über Nacht bei 16°C in Ligationspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.8, 10 mM

MgCl₂, 20 mM DTT, 50 µg/ml BSA) + 1mM frisches ATP. Die DNA-Konzentration (und Reaktionsvolumen) richtete sich nach dem $i = j$ Wert der Replikons (238); das ist der Wert der Initialkonzentration, bei dem Ring- und Konkatemerbildung gleich häufig sind. Dieser Wert wurde nach der Faustformel

$$\text{Konzentration} = \frac{65}{\sqrt{\text{Moleküllänge (in kb)}}} \quad (\text{in } \mu\text{g/ml})$$

errechnet. Bei gewünschter Konkatemerbildung wurde eine mindestens 10x größere, bei Ringbildung eine 10x kleinere DNA-Konzentration eingesetzt. Die Ligase wurde nach Bedarf durch Erhitzen bei 70°C, für 10' inaktiviert.

12.3 Konstruktion der Genbank aus Huhn-Calvaria

10 µg der Huhn-DNA (mit Eco RI partial gespalten und über einen Saccharose-Gradienten fraktioniert, s.Methode 10.1) wurde mit BAP an den 5'-Enden dephosphoryliert: Die DNA (1.45 - 2.15 pmol Enden) wurde dazu in 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, mit 31,2 U BAP (Boehringer) in einem Volumen von 50 µl, 45', bei 65°C inkubiert. Die Inkubation wurde mit 2 µl 50 mM EGTA gestoppt, die DNA mit Phenol extrahiert, mit Äthanol gefällt und in TE aufgenommen. 3 µg von dieser DNA (=0.22 - 0.32 pmol) wurden mit 4.15 µg λ Charon 4A-Armen (=0.22 pmol Armenpaare, s.Methode 10.1) in Ligase-Puffer, in einem Endvolumen von 50 µl, vereinigt. Die Konzentrationen (Huhn-DNA: 60, Phagen-Arme: 83, Gesamt-DNA: 143 µg/ml) wurden also so gewählt, daß die Bildung von Konkatermen begünstigt war ($i = j$ für Huhn-DNA bei: 13.8 - 16.8, für Phagen-Arme (als ein Molekül mit 30.7 kb) bei: 11.7 µg/ml). Die Lösung wurde jeweils 5' bei 70, 56, 37 und 20°C erwärmt und in Eis abgekühlt. 800 U T4 DNA-Ligase (Biolabs) und 1 mM ATP wurden dazu gegeben, und es wurde bei 16°C inkubiert. Die Erwärmungsschritte und die Ligasezugabe (und Zugabe von 1 mM ATP) wurden zweimal nach 23 und 43 Stunden wiederholt, und es wurde weiter inkubiert (Gesamtdauer der Ligation: 92 Stunden; Gesamt-Zugabe von Ligase: 2000 U). 1/10 des Inkubationsvolumens wurde zuerst probeweise, und anschließend - nachdem feststand, daß die Ligation gelungen war - wurde auch der Rest in vitro zu infektiösen Virionen verpackt (237). Dazu wurde 1 Aliquot des Verpackungsextraktes (20 µl, s.Methode 12.1) auf Eis aufgetaut, 5.4 µl der ligierten DNA wurden dazu gemischt, und es wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Lösung wird viskos). Ein zweites Aliquot des Verpackungsextraktes wurde aufgetaut, mit 2.5 µl 0.1 M MgCl₂ (Endkonzentration: 10 mM) und 2.5 µl 0.1 mg/ml DNase I (Endkonzentration: 10 µg/ml) versetzt, zum ersten Extrakt gegeben, und die Suspension wurde für eine weitere Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 0.45 ml TMG-Puffer und einen Tropfen Chloroform beendet. Die Ausbeute an Phagen wurde wie in Methode 12.4 beschrieben

bestimmt. Außer dem obigen Ansatz wurden die Phagen-Arme auch allein, ohne eukaryotische DNA, exakt gleich behandelt; sie geben auch Phagen, die mengenmäßig ca. 5.5% der Ausbeute mit der rekombinanten DNA ausmachen.

12.4 Titerbestimmung von Phagenlysaten und Phagenwachstum auf Agarplatten

Von Phagenlysaten wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) in TMG angefertigt. Jeweils 100 μ l aus diesen Verdünnungen wurden mit 100 μ l 10xZellen (s.Methode 8.3) vereinigt und 10' bei RT stehengelassen. Jeweils 2.5 ml flüssiger Soft-Agar (0.5% Agar in LBM Medium) (45°C) wurde zu der Bakterien-Phagen-Suspension pipettiert, geschüttelt und auf LBM+DT Agar (mit, bzw. ohne X Gal) gleichmäßig gegossen. Nach Erstarren des Soft-Agars wurden die Platten bei 32°C über Nacht bebrütet und die Plaques ausgezählt.

Für die Untersuchung des Hintergrunds der Genbank auf Minimalmedium wurden ca. 200 pfu zu 10 μ l 10xZellen gegeben, 10' bei RT adsorbieren gelassen, 2.5 ml Minimal-Soft-Agar (0.5% Agar, 0.5% NaCl, 10 mM MgSO_4) wurde dazugegeben und auf M9 + X Gal Agarplatten (0.1 mM CaCl_2 , 10 mM MgSO_4 , M9 Salze, 0.4% Maltose, 0.5% Casamino-säuren, 100 $\mu\text{g/ml}$ Diaminopimelinsäure, 40 $\mu\text{g/ml}$ Thymin, 40 mg/l X Gal, 1.5% Agar) gegossen. Es wurde bei 32°C für 2 Tage inkubiert. Zu Demonstrationszwecken (s.Abb.12) wurden Phagen von Plaques mit unterschiedlicher Morphologie von Voll- und Minimalplatten (s.oben) auf eine Minimalplatte (mit, bzw. ohne X Gal, s.oben) mit sterilen Zahnstochern übertragen, worauf ebenfalls 10 μ l 10xZellen nach der obigen Methode angebracht worden waren. Die Inkubation war bei 32°C für 2 Tage.

12.5 Reinigung der primären und amplifizierten Genbank

Zur primären Genbank (vgl.Methode 12.3) mit einem Volumen von 5.34 ml wurden 4.1 g CsCl gegeben (0.77 g/ml, mittlere Dichte ca. 1.5 g/ml). Die Phagen wurden in zuschmelzbare Zentrifugenröhrchen gefüllt (Auffüllen mit TMG + CsCl der gleichen Dichte) und mit dem VTi65-Rotor für 18 Stunden, bei 15°C , mit 40000 rpm zentrifugiert (Beckmann-UZ, Auslauf: ohne Bremse). Nach dem Lauf wurden die Röhrchen angestochen, und ca. 30 0.2 ml-Frak-tionen pro Röhrchen wurden gesammelt und getitert (Methode 12.4). Die Fraktionen mit Phagen wurden vereinigt, mit 0.01% Gelatine versetzt, gegen TMG-Puffer dialysiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Ausbeute, gemessen am Verpackungsergebnis, war 87.5%.

Die Amplifikation und Reinigung der Genbank wurde wie folgt vorgenommen: Nach der Identifizierung der positiven Klone (s.Methode 12.6) wurde zu jeder der zehn Platten 50 ml TMG gegeben, und die Platten wurden über Nacht im Kühlraum

(4°C) belassen. Die oberste Plattenschicht (M-Agarose) wurde dann abgekratzt und mit dem TMG-Puffer in einen Kolben gegeben. 5 ml Chloroform wurden dazupipettiert, und die Mischung wurde für 25', bei 37°C mit 150 rpm und dann - nach Zugabe von 1 mg/l DNase I bzw. RNase A - für 24 Stunden im Kühlen gerührt. Grobe Partikel wurden durch Filtration durch sterilen Verbandmull entfernt. Nach Zugabe von 1 M NaCl wurden die Phagen auf die gleiche Weise konzentriert und gereinigt, wie in Methode 8.3 ab diesem Schritt angegeben ist. Um die Position der (unsichtbaren) Phagen im CsCl-Gradienten festzustellen, wurde der Gradient wie oben fraktioniert (0.5 ml Fraktionen), Aliquote der Fraktionen wurden 1 : 400000 mit TMG verdünnt, und jeweils 1 µl davon wurde auf eine LBM+DT Agarplatte gegeben, worauf ein DP50supF-Bakterienrasen in M-Agarose eingebettet war (s.Methode 12.6). Nach Inkubation bei 32°C über Nacht wurden diejenigen Fraktionen vereinigt, die Plaques ergaben. Dieser pool der amplifizierten Genbank wurde ebenfalls mit 0.01% Gelatine versetzt, gegen TMG-Puffer dialysiert und bei 4°C aufbewahrt. In diesem Zustand nimmt der Lysattiter ca. um 1/3 pro Jahr ab.

12.6 Identifizierung und Reinigung der λCA608-Klone

Für das screening der Genbank wurden 10 große, 20 x 20 cm² Petrischalen benutzt, worauf jeweils 40000 pfu der Genbank plattiert wurden. Im Einzelnen wurde folgendes durchgeführt: die Platten, mit LBM+DT Agar, wurden zuerst 2 Stunden, bei 37°C, mit offenem Deckel unter UV-Licht getrocknet und dann mit geschlossenem Deckel bei der gleichen Temperatur warm gehalten. Für jede Platte wurden 1 ml 10xZellen (s.Methode 8.3) mit 0.5 ml rekombinanten Phagen (entsprechend ca.40000 pfu der gereinigten Genbank, s.Methode 12.5) vereinigt und 20', bei 37°C inkubiert. Diese Suspension wurde zu 35 ml M-Agarose (0.7% Agarose, 10 mM MgSO₄, gehalten bei 45°C) gegeben, blasenfrei gerührt und sofort auf eine Platte gleichmäßig gegossen; Blasen, die evtl. beim Gießen entstanden waren, wurden mit einer heißen Kanüle zerstört. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Platten über Nacht bei 32°C bebrütet; diskrete Plaques wachsen unter den gewählten Bedingungen bis zu einem Durchmesser von 0.5 - 1 mm. Die Plaques-DNA wurde auf Nitrozellulose übertragen und mit nicktranslatierter pST608-DNA hybridisiert, wie unter den Methoden 23.3 und 24. angegeben. Die erhaltenen Hybridisierungssignale wurden mit einem begrenzten Areal auf den Platten korreliert (Durchmesser: ca. 1 cm).

Die positiven Klone wurden von den anderen Phagen in diesem Areal durch folgende Schritte gereinigt: Phagen von etwa 70 - 100 individuellen Plaques wurden mit sterilen Zahnstochern in geordnetem Muster auf DP50supF-Bakterien transferiert (0.1 ml 10xZellen, eingebettet in M-Agarose auf einer 56 cm² LBM+DT Agarplatte). Die Phagen wurden, wie bei

den Ausgangsplatten beschrieben (s.oben), bebrütet, ihre DNA auf Nitrozellulose transferiert und mit nicktranslatierter DNA hybridisiert; 1 - 2 positive Signale wurden pro Platte erhalten. Ein dazu korrespondierendes Plaque wurde (mit der darunterliegenden Agaroseschicht) mit Hilfe der Kehrseite einer Pasteur-Pipette in 1 ml TMG + 1 Tropfen Chloroform übertragen, mit dem Vortex gerührt und zentrifugiert (1', Eppendorf). Von den diffundierten Phagen im Überstand wurde ein Verdünnungsausstrich mit einer sterilen Platin-Öse auf DP50supF-Bakterien angefertigt (Agarplatte: wie oben), und die Platte wie üblich bebrütet. Die oben beschriebenen Schritte der Reinigung ab dem Plaque-Transfer mit Zahnstochern bis zur Hybridisierung wurden mit den Plaques des Verdünnungsausstriches wiederholt; hier war rund die Hälfte der untersuchten Plaques positiv. Ein positives Plaque wurde wie oben entfernt, in TMG + Chloroform transferiert, und die sich darin befindenden Phagen ein letztes Mal auf ihre Reinheit hin mit der gleichen Prozedur (Verdünnungsausstrich, Plaques-Transfer und in situ Hybridisierung, s.oben) überprüft. Ausnahmslos alle untersuchten Plaques führten hier zu positiver Hybridisierung. In diesem letzten Phagenlysat war also der jeweilige λ CA608-Klon praktisch vollständig rein; dieses Lysat wurde von der Agarose durch Zentrifugation abgetrennt, getitert (s.Methode 12.) und bei 4°C aufbewahrt.

12.7 Herstellung von genomischen Subklonen

Um die Subklone pCA-3.8-r, pCA-3.8-l, pCA-2.15 und pCA-1.5 zu konstruieren, wurde folgendermaßen gearbeitet: Der Vektor pUC9 und Klon λ CA608-9 wurden mit Hin dIII gespalten; pUC9 wurde zusätzlich mit CIP an den 5'-Enden dephosphoryliert. Ca. 0.5 μ g des Vektors (im molaren Überschuß) und 0.5 μ g der λ CA608-9 DNA wurden in Ligationspuffer + 1mM ATP vereinigt (Endvolumen: 50 μ l) und mit 320 U T4-DNA-Ligase (Biolabs) über Nacht, bei 16°C miteinander ligiert. JM 83 wurde mit dem Ligationmix transformiert (s.Methode 12.11) und auf LB + X Gal + Ampizillin Agarplatten plattiert. Ca. 90% der Kolonien waren weiß. Zur Identifizierung der Klone mit dem 3.8 kb Hin dIII-Fragment (s.Abb.16), wurde letzteres vom Klon λ CA608-9 isoliert (s.Methode 10.2) und nicktranslatiert (Methode 13.1). Die Transformanten wurden, wie in Methoden 23.2 und 24. beschrieben, in situ mit der nicktranslatierten DNA hybridisiert; die meisten weißen Transformanten ergaben ein positives Signal. 12 positive Transformanten wurden angezogen, und ihre DNA wie in der Methode 8.6.2 analysiert; Spaltung mit Hin dIII und Vergleich mit dem Muster von λ CA608-9 in der Gelelektrophorese hat gezeigt, daß 7 davon nur das 3.8 kb Fragment enthalten; die restlichen 5 enthalten zusätzlich noch 1 - 2 weitere, vom eukaryotischen λ CA608-9 Teil stammende Hin dIII Fragmente, die auf Grund der Konstruktionsart wahrscheinlich religiert wurden; diese Subklone wurden nicht weiter analysiert. Die Orientierung

des 3.8 kb Fragmentes in pUC9 wurde durch Eco RI-Spaltung und elektrophoretische Analyse ermittelt: Eco RI spaltet 1x das Fragment, *asymmetrisch* bezogen auf die äußeren Hin dIII-Stellen, und 1x den Vektor in der Polyrestriktionsstelle. 3 Subklone, die Fragmente der ungefähren Längen 4.85 und 1.5 kb produzieren, wurden pCA-3.8-r, 4 solche, die Fragmente mit 4.2 und 2.15 kb erzeugen, wurden pCA-3.8-l genannt.

Um die Subklone pCA-2.15 und pCA-1.5 zu konstruieren, wurde jeweils ein Aliquot (1.5 µl, entsprechend 0.3 µg) der Eco RI-Spaltungen von pCA-3.8-r, bzw. -l in einem Endvolumen von 50 µl Ligasepuffer - wie oben beschrieben - mit sich selbst ligiert und in JM 83 transformiert. (Die gewählte DNA-Konzentration fördert die monomolekulare Zyklisierung, vgl. Methode 12.2). Die DNA von jeweils 6 Kolonien wurde durch Eco RI und/oder Hin dIII-Spaltungen analysiert, und die erwartete Struktur wurde dadurch bestätigt. Subklone mit dem 2.15 kb Hin dIII - Eco RI-Fragment (stammend von pCA-3.8-r) wurden pCA-2.15 und Subklone mit dem 1.5 kb Hin dIII - Eco RI-Fragment (stammend von pCA-3.8-l) wurden pCA-1.5 genannt. Letztere produzieren auf X Gal-Platten - trotz der Insertion - hellblaue Kolonien.

Für die Konstruktion von pST-EcoBgl und pST-BglHind wurde wie folgt verfahren: Der Subklon pST608 (s.(2)) wurde mit Bgl II und Eco RI bzw. mit Bgl II und Hin dIII gespalten und mit CIP an den 5'-Enden dephosphoryliert. Der Vektor pUC9 wurde mit Bam HI und Eco RI bzw. mit Bam HI und Hin dIII gespalten. 0.4 µg pUC9/Bam HI+Eco RI wurden mit pST608/Bgl II+Eco RI (ca. 0.23 µg *Insert*) und 0.4 µg pUC9/Bam HI+Hin dIII wurden mit pST608/Bgl II+Hin dIII (ca. 1 µg *Insert*) in jeweils 50 µl ligiert. Transformation in JM 83 und DNA-Analyse von einigen weißen Transformanten waren ähnlich wie bei pCA-2.15 und pCA-1.5. Die erste Ligationskombination (s.oben) ergab Subklon pST-EcoBgl, die zweite ergab Subklon pST-BglHind. Die Inserts können z.B. mit Eco RI+Sal I (bei pST-EcoBgl) und mit Hin dIII+Eco RI (bei pST-BglHind) vom Vektorrest befreit werden; ihre Identität konnte auch durch weitere Spaltungen mit Sph I, Ava I und Sma I und Vergleich mit der bekannten genomischen Restriktionskarte (2) bestätigt werden.

12.8 pFPl-Konstruktion

Die Vollständigkeit der Reaktionen und die Intaktheit der Moleküle wurden praktisch bei jedem Schritt der pFPl-Konstruktion kontrolliert; es erscheint wertvoll, außer den Konstruktionsschritten hier auch die wesentlichen der durchgeführten Kontrollen wiederzugeben. Für die Vektormodifikationen wurde wie folgt verfahren: pUC9 wurde mit Hin cII (BRL) gespalten; ungewöhnlich hoher Überschuß an Enzym mußte für eine vollständige Spaltung eingesetzt werden. Um die Intaktheit der Enden zu überprüfen, wurde ein

Aliquot (2 µg) in 5 µl mit sich selbst ligiert, ein Teil davon wieder mit *Hin* cII gespalten, und die zwei Reaktionen elektrophoretisch analysiert: Nach der Ligation entstehen lineare Oligomere (Vielfache von 2.75 kb), die mit *Hin* cII wieder gespalten werden. Ein kleines Aliquot der *Hin* cII-gespaltenen DNA wurde anschließend an den 3'-Enden mit α -³²P-dCTP radioaktiv markiert (s. Methode 13.3). Die Hauptmenge von pUC9/*Hin* cII wurde mit Phenol extrahiert, mit Äthanol gefällt und in HIGH-Puffer aufgenommen; 4facher Überschuß an Bam HI wurde dazugemischt, und ein Aliquot wurde zu einem Teil der radioaktiven DNA gegeben; die zwei Bam HI-Ansätze wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert und wie üblich (s. Methode 9.1) gestoppt und gereinigt. Die radioaktive DNA, vor und nach der Bam HI-Spaltung, wurde über ein nicht-denaturierendes 20%iges PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, und ein Autoradiogramm vom Gel wurde angefertigt: Bei der Bam HI-gespaltenen DNA tritt, außer der Bande auf der Höhe der nicht-Bam HI-gespaltenen DNA, eine zusätzliche, ca. 9 bp-lange Bande; die zwei Banden wurden ausgeschnitten und ihre Strahlung gemessen: sie war annähernd gleich. Dies war ein starker Hinweis, daß auch im Hauptansatz die Bam HI-Schnittstelle erkannt und vollständig gespalten worden war. Die Vektor-DNA wurde mit TE auf 0.4 mg/ml verdünnt, und das kurze *Hin* cII-Bam HI Fragment durch i-Propanol-Fällung eliminiert: Die DNA wurde 10', bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt, mit 0.5 M NaClO₄ versetzt, 0.9 Volumina i-Propanol wurden dazugegeben, die Lösung wurde 15' auf Eis belassen und 15' im Kühlen zentrifugiert (Eppendorf). Das Pellet wurde wieder im ursprünglichen Volumen TE aufgenommen, und die Schritte der Fällung wurden wiederholt. Das Pellet wurde mit 70% Äthanol in Wasser gewaschen und in TE aufgenommen.

Das Plasmid pC550 wurde folgendermaßen präpariert: Zuerst wurde es mit *Hin* dIII gespalten. Um die vorstehenden 5'-Enden aufzufüllen, wurde die DNA in NT-Puffer aufgenommen (Konzentration: 0.6 mg/ml), wobei noch jeweils 60 µM dATP, dGTP, und TTP zugegen waren. 5 U Klenow-Polymerase wurde dazu pipettiert, und ein Aliquot dieses Mixes wurde zu 7.6 pmol (lyophilisiertem) α -³²P-dCTP gegeben. Zum Hauptmix wurde noch dCTP (ebenfalls 60 µM) pipettiert, und die zwei Ansätze wurden 30' bei RT inkubiert. Die Reaktionen wurden gestoppt, der Ansatz mit der radioaktiven DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, und das Gel wurde autoradiographisch analysiert; die gelungene Elongation wurde durch das Erscheinen einer radioaktiven Bande bei 2.75 kb aufgezeigt. Um sicherzustellen, daß dadurch glatte Enden produziert wurden, wurde ein Aliquot der DNA, analog dem pUC9/*Hin* cII, mit sich selbst ligiert und ein Teil davon mit *Hin* dIII inkubiert: Die Ligation ergibt ebenfalls lineare Oligomere, die jedoch mit *Hin* dIII nicht spaltbar sind. Der Hauptansatz wurde mit Bam HI nachgespalten, und die DNA wurde mit CIP an den 5'-Enden dephosphoryliert und in TE aufgenommen.

Ligiert wurden jeweils 0.2 µg Vektor-DNA und 1 µg

behandelte pC550-DNA mit 400 U T4 DNA-Ligase in 50 μ l, und nach nochmaliger Zugabe von 200 U Ligase wurde für weitere 5 Stunden bei RT inkubiert (molares Verhältnis von pC550-Insert zu pUC9: wie 5 zu 1). Außerdem wurden die zwei DNAs unter den gleichen Bedingungen (zur Feststellung des Hintergrunds) mit sich selbst ligiert. Die Ligationsansätze wurden in JM 83 transformiert und auf LB+Ampizillin+X Gal Agarplatten plattiert. Sowohl der pUC9/pC550-, als auch der pUC9-Selbst-Ligationsansatz führten zu blauen und weißen Kolonien; der pC550-Selbst-Ligationsansatz ergab (wie erwartet) nur weiße Kolonien, die nicht weiter beachtet werden. Das Verhältnis von weißen zu blauen Kolonien war beim pUC-Ansatz wie 9 : 1 (Hintergrund), wobei es beim pUC9/pC550-Ansatz wie 4 : 1 war; die Verdopplung der Anzahl der blauen Kolonien, innerhalb der jeweiligen Transformantenmenge, wurde als Indiz für eine erfolgreiche pFPl-Rekombination gewertet. 13 blaue Kolonien vom pUC9/pC550-Transformationsansatz wurden angezogen und ihre DNA nach Methode 8.6.1 analysiert. Es zeigte sich, daß 5 davon ein Plasmid mit der für pFPl erwarteten Migration in der Elektrophorese enthielten; die restlichen Kolonien enthielten den rekonstituierten (bzw. nicht gespaltenen) Vektor selbst.

12.9 Konstruktion und Analyse von pFPl-Derivaten

pFPlH⁻ wurde durch folgende Manipulationen hergestellt: 10 μ g pFPl-DNA wurden mit Hin dIII vollständig gespalten, und die Hälfte davon wurde mit Klenow (Boehringer, 15 U) und allen 4 dNTPs (jeweils 30 μ M) im NT-Puffer (Endvolumen: 50 μ l), bei RT, 30' inkubiert. Die Reaktion wurde wie üblich gestoppt, und die DNA gereinigt und in TE aufgenommen. 0.4 μ l von jeder DNA (d.h.: pFPl/Hin dIII und pFPl/Hin dIII /Klenow-aufgefüllt) wurden dann separat in einem Volumen von 0.1 ml unter den üblichen Bedingungen ligiert, nach erneuter Zugabe von 400 U Ligase (Biolabs) und 1 mM ATP für weitere 10 Stunden bei RT und über Nacht bei 4°C inkubiert (Gesamt-Ligationsdauer: 37 Stunden). Die Ligase wurde inaktiviert, 75 μ l der Ansätze wurden entnommen und mit Hin dIII nachgespalten. Die restlichen 25 μ l der Ligation und 25 μ l der Hin dIII Nachspaltung wurden im Agarosegel (TBE) elektrophoretisch analysiert. Mit den übrigen 50 μ l der Nachspaltung wurde JM 83 transformiert (Plattierung auf LB+Ampizillin+X Gal). Die aufgefüllte DNA ergab (blaue) Transformanten (3.1×10^6 cfu/ μ g), wohingegen die nicht-aufgefüllte nur zu Hintergrund-Kolonien führte (4.7×10^4 cfu/ μ g).

pFPlB⁻ wurde nach dem gleichen Muster, mit folgenden Unterschieden, konstruiert: Ausgehend von pFPl wurde die Bam HI Stelle der Polyrestriktionsstelle geschnitten und aufgefüllt; und nach der Selbstligation wurde vor der Bam HI Nachspaltung der Ligasepuffer mit 0.1 M NaCl versetzt. Der Lac Phänotyp von pFPlB⁻ kann von pFPl, bzw. pFPlH⁻ nur auf McConkey+Lactose Platten unterschieden werden (nicht auf X Gal Platten). Nach genau der gleichen Prozedur wurde die

Bam HI Stelle von pFP1E⁻ (s.unten) zur Erzeugung der Doppelmutanten pFP1B⁻E⁻ modifiziert.

Da pFP1 zwei Eco RI Stellen besitzt, war die Konstruktion von pFP1E⁻ nicht, wie für die anderen pFP1-Derivate, *direkt* möglich; zu diesem Zweck wurde die 4 bp-Insertion zuerst in die Eco RI Stelle des Vektors pUC9 eingeführt, und dann wurde das C550-Insert von pFP1 in das modifizierte pUC9 umkloniert. Die pUC9-Modifikation erfolgte entsprechend den oben beschriebenen Methoden; Dieses sogenannte pUC9E⁻ Plasmid wurde im JM 83 angezogen; der JM 83(pUC9E⁻) Phänotyp ist vollständig Lac⁻. Die Plasmide pUC9E⁻ und pFP1 wurden mit Pst I und Bam HI geschnitten; pFP1 wurde zusätzlich - zur Verhinderung der Religation des Inserts in die ursprüngliche Stelle bei den anschließenden Schritten - mit Hin dIII geschnitten und mit CIP an den 5'-Enden dephosphoryliert. Die kurzen Fragmente der Polyrestriktionsregion (Pst I-Bam HI bei pUC9E⁻ und Hin dIII-Pst I bei pFP1) wurden mittels i-Propanolfällung (vgl.dazu Methode 12.8) weitgehend eliminiert. 0.2 µg von pUC9E⁻ und 0.45 µg von pFP1 wurden dann in 50 µl ligiert und in JM 83 transformiert. Es entstanden weiße und blaue Transformanten (auf X Gal-Platten); Restriktionsanalyse zeigte, daß Plasmide von blauen Transformanten die erwartete DNA-Struktur besitzen (Verlust der Eco RI Stelle in der pUC9-Polyrestriktionsregion); diese Plasmide wurden pFP1E⁻ genannt. Sie weisen auf McConkey+Laktose Platten den gleichen Phänotyp wie pFP1B⁻ auf.

12.10 pFP2-Konstruktion

Für die pFP2-Konstruktion wurden die Reaktionspartner auf folgende Weise vorbereitet: 100 µg pMC1871 wurden mit Sma I gespalten und gereinigt. 250 µg pFP1 wurden mit Pvu II gespalten, die Spaltungsprodukte in einem präparativen 1.5%igen Agarosegel aufgetrennt, und das Insert mit der eukaryotischen Sequenz mittels Biotrap (s.Methode 10.2) eluiert. Jeweils 10 µg des Vektors und 2.5 µg des Pvu II-Inserts wurden mit CIP an den 5'-Enden dephosphoryliert. Um eine effiziente Ligation der glatten DNA-Enden zu erzielen, wurden in drei Ansätzen (jeweils 50 µl) verschiedene Mengen der Reaktionspartner, wie unten angeführt, angesetzt; dabei bedeuten: P: nicht dephosphorylierte DNA; OH: dephosphorylierte DNA; in Klammern werden die molaren Verhältnisse der DNA-Moleküle angegeben.

	pMC1871-Vektor		Pvu II-Insert
1.)	0.2 µg OH (1)	+	0.1 µg P (4)
2.)	0.2 µg P (1)	+	0.25 µg P (10)
3.)	0.2 µg P (1)	+	0.5 µg OH (20)

Die Vektorkonzentration (4 µg/ml) wurde bei allen Ansätzen 5x niedriger als der $i = j$ Wert für das lineare pMC1871 festgesetzt (=20.15 µg/ml, vgl.Methode 12.2), um die Zirkularisierung zu favorisieren. Die Insert-Menge war ein Kompromiß zwischen dem nötigen molaren Überschuß gegenüber pMC1871 und der zu vermeidenden Selbstligation. Es wurde über Nacht wie üblich und 4 Stunden bei RT ligiert. Die drei Ansätze wurden vereinigt, der Stamm CSH 50 wurde damit transformiert, auf LB+Tetrazyklin+X Gal bzw. McConkey+Tetrazyklin+Laktose Agar plattiert und nach 2 Tagen bei 37°C ausgewertet. Das Verhältnis von rein weißen zu nicht-weißen Transformanten (auf X Gal) war wie 2 : 1.

12.11 Transformation von E.coli mit Plasmiden

Die Einführung von pBR322, pUC9, pMC1871, sowie Derivaten dieser Plasmide in E.coli K12-Stämme wurde grundsätzlich nach folgender Methode durchgeführt (239): Eine gesättigte über Nacht Kultur des zu transformierenden Stammes wurde 1 : 100 in 50 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C, mit 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀=0.2 geschüttelt. Die Bakterien wurden in Eis abgekühlt und 10', bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert. Sie wurden in 20 ml eiskaltes 0.1 M CaCl₂ resuspendiert und in Eis für 25' inkubiert. Anschließend wurden sie wie oben abzentrifugiert, in 0.5 ml eiskaltes 0.1 M CaCl₂ aufgenommen und für 24 Stunden in Eis belassen (vgl.unten den Effekt einer kürzeren Inkubation in Eis). Die transformierende DNA wurde zu jeweils 0.1 ml der konzentrierten Bakterien gegeben, und der Ansatz wurde für 15' auf Eis inkubiert. Ligationsansätze wurden als solche, ohne weitere Behandlung, zu den Bakterien gegeben. Falls das Volumen der zugegebenen DNA-Lösung mehr als 10 µl betrug, wurde die Endkonzentration des Ansatzes an CaCl₂ auf 0.1 M berichtigt. Die Bakterien wurden für 5', bei 37°C inkubiert und wieder ins Eis gestellt. Es wurde 1 ml LB-Medium zugesetzt und 1 Stunde, bei 37°C mit 160 rpm geschüttelt. 0.1, 1 und 10 µl dieser Suspension wurden dann auf 1.5% Agarplatten mit Selektivmedium (LB mit 50 µg/ml Ampizillin, bzw. 10 µg/ml Tetrazyklin) mit dem Drygalski-Dreieck ausplattiert. Der Rest des Transformationsansatzes wurde bei 4°C aufbewahrt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die Kolonien ausgezählt. Je nach Bedarf wurden die restlichen transformierten Bakterien mit einer

Dichte von ca. 200 cfu/Platte ebenfalls ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde systematisch für folgende Stämme nach verschieden langer Inkubationsdauer in Eis untersucht (Angaben als $\times 10^6$ cfu/ μg pUC9):

Stamm	90' in Eis	24 Stunden in Eis
C 600	0.55	4.8
HB 101	0.77	4.4
CSH 50	1.30	7.9
JM 83	0.88	7.3
JM 103	0.22	0.7

13. Radioaktive Markierung von DNA *in vitro*

13.1 Nick-Translation

Zur Markierung von DNA durch Nick-Translation (240) wurden die DNA (0.5 - 1 μg), 100 μCi eines α - ^{32}P -dNTPs (=33.3 pmol), 7.2 μM ATP, 30 μM von jedem der restlichen drei dNTPs und 200 pg frisch verdünnter DNase I im NT-Puffer vereinigt (Endvolumen: 18 μl) und 15', bei 14°C inkubiert. 10 U (2 μl) DNA-Polymerase I (Biolabs, Holoenzym) wurde anschließend dazupipettiert, und die Reaktion wurde für weitere 2 Stunden, bei der gleichen Temperatur fortgesetzt. Die Reaktion wurde mit 20 mM EDTA und 10' Inkubation bei 70°C gestoppt. Der Ansatz wurde mit Phenol extrahiert, und die markierte DNA von Salzen und überschüssigen Nukleotiden über eine G 50-Sephadex Säule gereinigt. Dazu wurde eine 15 cm lange Säule (Durchmesser: 1 cm) mit 10 ml gequollenem Sephadex G 50 gepackt, mit 0.1xTE Puffer äquilibriert, und die radioaktive DNA wurde aufgetragen; als Laufmarker wurden zur DNA-Lösung BPB und XC dazugegeben. 0.4 ml Fraktionen wurden aufgefangen, und die Strahlung wurde gemessen; die Fraktionen um den ersten peak (ca. 1.5 ml) wurden vereinigt. Die reine DNA wurde gewöhnlich in diesem Zustand bei -20°C aufbewahrt. Wenn nötig, wurde das Volumen durch Äthanolpräzipitation, bzw. i-Butanol-Extraktion (wie in Methode 10.2 beschrieben), bzw. durch Lyophilisation (s. Methode 5.) auf 1/10 reduziert. Die Ausbeute betrug in der Regel 60 - 70% Einbau des radioaktiven Nukleotids und die spezifische Aktivität 1 - 3×10^8 cpm/ μg DNA. Analyse der DNA in TBE- und alkalischen Agarosegelen ergab, daß die Sekundärstruktur erhalten war und daß Einzelstrangbrüche alle 400 ± 200 Nukleotide eingeführt worden waren.

13.2 Markierung überstehender 5'-Enden

Überstehende 5'-OH Enden³² (nach Dephosphorylierung, vgl. Methode 11.) wurden mit γ -³²P-ATP und Polynukleotidkinase (PNK) markiert. Das molare Verhältnis von DNA-Enden zu ATP war mindestens 1 : 10. γ -³²P-ATP wurde nach Bedarf lyophilisiert, bzw. als wässrige Lösung zur Reaktion gegeben. Zum Beispiel, 30 μ Ci γ -³²P-ATP, 1 μ g dephosphorylierte DNA (in TE), der PNK-Puffer (Endkonzentrationen: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 M Spermidin, 10 mM DTT) und 10 U PNK (PL) wurden zu einem Endvolumen von 50 μ l zusammenpipettiert und für 30', bei 37°C inkubiert. Die PNK wurde mit 2 M Ammoniumazetat und 5' Inkubation bei 65°C gestoppt. Der Ansatz wurde mit Phenol extrahiert, und die markierte DNA von Salzen und überschüssigem ATP über eine G 50-Sephadex Säule (s. Nick-Translation) gereinigt.

13.3 3'-Endmarkierung von DNA

Zur Markierung von 3'-DNA-Enden wurde, bei vorstehenden 5'-Enden als "template", das 3'-OH Ende um 1 α -³²P-Desoxynukleotid elongiert; bei glatten Enden wurde das 3'-terminale Desoxynukleotid gegen das gleiche radioaktive (α -³²P-dNTP) ausgetauscht. (Molares Verhältnis von Nukleotid zu 3'-DNA-Enden: mindestens 10 : 1.) Die Einbaureaktion des neuen Nukleotids wurde vom Klenow-Enzym () katalysiert. Dazu wurden das α -³²P-dNTP (lyophilisiert oder als wässrige Lösung), die DNA (0.5 - 1 μ g) und die Klenow-Polymerase (5 U) im NT-Puffer für 30', bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde wie bei der Nick-Translation gestoppt und gereinigt. Statt der ³²P-Nukleotiden wurden auch α -³⁵S-dNTPs benutzt.

14. Radioaktive Markierung von DNA in vivo

Das Plasmid pC550 wurde nach folgenden Methode in vivo radioaktiv markiert: 50 ml LB Medium+Ampicillin (100 μ g/ml) wurden mit Glyzerinkultur entweder von E.coli HB 101(pC550) oder von C 600(pC550) angeimpft und über Nacht bei 37°C, mit 160 rpm bis zur Sättigung geschüttelt. Davon wurde 1 ml entnommen und mit phosphatfreiem, modifiziertem M9 Medium (0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, phosphatfreie M9 Salze, 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5, 0.4% Glukose, 80 μ g/ml von allen zwanzig physiologischen L-Aminosäuren, 10 μ g/ml Thiamin 100 μ g/ml Ampicillin) zweimal gewaschen. 0.5 ml der gewaschenen Bakterien wurden zu 50 ml vom obigen Medium gegeben, das mit 50 μ M KH₂PO₄ supplementiert war. Die Suspension wurde bei 37°C, mit 160 rpm geschüttelt, bis die OD₆₀₀=0.1 war. 2 mg/ml Uridin wurden dazugegeben, und es wurde bis zu einer OD₆₀₀=0.6 weiter geschüttelt. Chloramphenicol wurde zu den Bakterien gegeben (100 μ g/ml) und für zwei Stunden unter

Schütteln wirken gelassen (182). 1 ml der Kultur wurde abgenommen und zu 1 mCi $H_3^{32}PO_4$ (von NEN bzw. Amersham, trägerfrei, 50 - 100 μ l) gegeben. Der Ansatz wurde dann bei 37°C, über Nacht mit 160 rpm geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde wie in der Methode 8.6.2 beschrieben isoliert, über eine G 50-Sephadexsäule gereinigt (vgl. Methode 13.1) und durch Elektrophorese im Agarose-Gel (TBE) analysiert. Durch diese Methode erhält man 1 - 2 μ g Plasmid-DNA/ml Kultur, die größtenteils in der superhelikalen Form ist. Die Autoradiographie des Gels zeigte, daß von den isolierten Makromolekülen das Plasmid die Hauptmenge der Radioaktivität enthielt (60 - 80%). Markiert ist noch ein kleiner Teil des Chromosoms, sowie ein weiterer bakterieller Bestandteil, wahrscheinlich das Lipopolysaccharid. Reine DNA konnte durch Chromatographie an Elutip-d erhalten werden (s. Methode 17.2). Die spezifische Aktivität wurde auf ca. 5×10^6 cpm/ μ g DNA geschätzt.

15. Sequenzierung von DNA

15.1 Nach Maxam und Gilbert

Der Teil des genomischen Subklons pST608 um die Sma I-Stelle (s.(2) und Abb.15) wurde auf folgende Weise sequenziert (233): 10 μ g des pST608-Plasmids wurden mit Xma I gespalten; Xma I ist ein Isoschizomer von Sma I, hinterläßt jedoch im Gegensatz dazu *vorstehende* 5'-Enden, die sich leichter markieren lassen. Die DNA wurde mit Phenol extrahiert, mit Äthanol präzipitiert und mit CIP an den 5'-³²P-Enden dephosphoryliert. Sie wurden dann mit PNK und γ -³²P-ATP radioaktiv markiert (s.Methode 13.2) und mit Pvu II nachgespalten; Pvu II spaltet den Subklon (u.a.) asymmetrisch links und rechts von der Xma I-Stelle (2). Die dabei entstandenen zwei radioaktiven Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 6%igen PAA-Gel (TBE, nicht-denaturierend) aufgetrennt, und ihre Position wurde durch Autoradiographie des feuchten Gels (10') identifiziert; nach den verwendeten Markern (ϕ X174/Hae III und pBR322/Hpa II, an den Enden ebenfalls radioaktiv markiert) beträgt ihre Länge ca. 900 ("links" von Xma I) bzw. 500 bp ("rechts" von Xma I). Das Gel wurde an diesen Stellen ausgeschnitten, die Fragmente wurden elektrophoretisch eluiert (s.Methode 10.2), mit Äthanol präzipitiert und in einer Konzentration von $4.1 - 5.4 \times 10^6$ cpm/ μ l in 0.1xTE aufgenommen. Die basenspezifischen Reaktionen wurden wie im unteren Diagramm angegeben durchgeführt; die Eppendorf-Gefäße waren silikonisiert; wenn nicht anders spezifiziert, wurden alle Ansätze und Reagenzien in Eis gehalten.

Die Abkürzungen sind: DMS = Dimethylsulfat; R = die radioaktive DNA; HZ = Hydrazin.

Die Puffer sind:

DMS-Puffer: 50 mM Natrium-Kakodylat, pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA.

DMS-Stop: 1.5 M Na-Azetat, pH 7.0, 1 M β -Merkaptoäthanol, 100 $\mu\text{g/ml}$ tRNA aus E.coli.

HZ-Stop: 0.3 M Na-Azetat, pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 25 $\mu\text{g/ml}$ tRNA aus E.coli.

Auftragspuffer: 80% Formamid, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% BPB, 0.1% XC.

Guanosine	Purine	Pyrimidine	Cytidine
1 μl	(= 1 μg)	K a l b s t e s t i s - D N A	
200 μl DMS-Puffer	-	18 μl H_2O	20 μl 5 M NaCl
8 μl R	16 μl R	16 μl R	8 μl R
1 μl DMS	25 μl 88% Ameisensäure	30 μl HZ	30 μl HZ
4'	6'	6'	16'
I n k u b a t i o n b e i 21 ° C			
50 μl DMS-Stop	J e w e i l s	200 μl	H Z - S t o p
750 μl Äthanol, mischen, 15' bei -80°C ; 15' bei 4°C zentrifugieren (Eppendorf); Überstand abpipettieren			
Pellets in 250 μl 0.3 M Natriumazetat, pH 6.6, aufnehmen			
750 μl Äthanol, mischen, 15' bei -80°C ; 15' bei 4°C zentrifugieren (Eppendorf); Überstand abpipettieren			
Pellets mit 1 ml absolutem Äthanol waschen; 2' bei -80°C ; 15' bei 4°C zentrifugieren (Eppendorf); Überstand abpipettieren			
Pellets 15' lyophilisieren			
In 100 μl 1 M Piperidin (frisch mit H_2O verdünnt) aufnehmen; 30' bei 90°C ; $\rightarrow$ Eis			
Über Nacht lyophilisieren			
2 x (in 10 μl H_2O aufnehmen; lyophilisieren)			

Jeweils in 10 μ l Auftrags-Puffer aufnehmen;
 1' bei 90°C; $\rightarrow$ Eis;
 sofort auf PAA-Sequenzgele auftragen (s.Methode 1.5)

15.2 Mit der "Didesoxy"-Methode (nach Sanger)

Die Sequenz der Hin cII/Hin dIII-Junktion von pFP1 (s.Resultate, 13.1, und Abb.24) wurde nach (195) bestimmt: 2 μ g pFP1-DNA, in der superzirkulären Form, wurden in 20 μ l 0.2 M NaOH aufgenommen und 5', bei RT inkubiert. Die Lösung wurde mit 2 μ l 2 M Ammoniumazetat, pH 4.5, neutralisiert. 44 μ l Äthanol wurden zugegeben, der Ansatz 30' bei -20°C belassen und für 15', bei 4°C, zentrifugiert (Eppendorf). Das DNA-Pellet wurde mit 70%igen Äthanol (in Wasser) gewaschen, wie oben zentrifugiert und im Exsikkator gut getrocknet. Dazu wurden dann 1.5 μ l 10x Puffer (Ausgangskonzentrationen: 70 mM Tris-Cl, pH 7.5, 70 mM MgCl₂, 50 mM β -Merkaptoäthanol, 1 mM EDTA), 2 μ l α -³⁵S-dATP, 2.5 pmol "revers sequencing"-Primer (Boehringer) und Wasser zu einem Endvolumen von 14.5 μ l gegeben. Das Pellet wurde gut gelöst, 15' bei 37°C inkubiert, und 0.5 μ l Klenow-Polymerase (2.5 U, Boehringer) wurden dazu gegeben. Jeweils 3 μ l davon wurden zu den vier Reaktions-Gefäßen gegeben, welche jeweils 2 μ l der entsprechenden Desoxy- und Didesoxynukleotid-Mixen enthielten. Die Mixe (Ausgangskonzentrationen im obigen 1x Puffer) waren:

A-Mix: 250 μ M ddATP, 100 μ M dGTP, 100 μ M TTP, 100 μ M dCTP.

G-Mix: 500 μ M ddGTP, 5 μ M dGTP, 100 μ M TTP, 100 μ M dCTP.

T-Mix: 500 μ M ddTTP, 5 μ M TTP, 100 μ M dGTP, 100 μ M dCTP.

C-Mix: 500 μ M ddCTP, 10 μ M dCTP, 100 μ M dGTP, 100 μ M TTP.

Es wurde 15' bei 37°C inkubiert, 1 μ l "chase"-Lösung (Ausgangskonzentrationen: jeweils 125 μ M von dATP, dGTP, TTP und dCTP) wurde dazugemischt, und der Ansatz wurde durch Inkubation bei RT, für weitere 15', zur Kompletion gebracht. Zu jeder Reaktion wurden dann 2.5 μ l Auftragspuffer (s.Methode 15.1) gegeben, und die Reaktionsprodukte wurden in einem PAA-Sequenzgel analysiert (s.Methode 1.5).

16. Analyse von DNA durch Bal 31- und Eco RI-Spaltungen

16.1 Analyse von λ Charon 4A-DNA

10 μg λ Charon 4A-DNA (entsprechend: 0.7 pmol Enden) wurde bei 30°C, mit 21 U Bal 31-Nuklease (Boehringer), in 110 μl Bal 31-Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.2, 0.6 M NaCl, 12.5 mM MgCl₂, 12.5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA) inkubiert. Aliquote von 10 μl wurden zu den in Abb.18 gezeigten Zeiten der Reaktion entnommen, zu 0.8 μl 0.2 M EGTA gegeben (Endkonzentration: 15 mM), 5', bei 65°C erhitzt und ins Eis gestellt. Zu den Aliquoten wurden jeweils 54 μl Ionenberichtigungs-Puffer (Ausgangskonzentrationen: 46.7 mM Tris-Cl, pH 7.5, 8 mM MgSO₄, 6 mM β -Merkaptoäthanol) und 1.5 μl Eco RI (18 U, Boehringer) gegeben, und es wurde 40', bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 10 μg tRNA (E.coli), 0.1 M Na-Azetat, pH 7.0, und 2.5 Volumina Äthanol versetzt, 15', bei -80°C gekühlt und 15', bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf). Das Pellet wurde in Auftragspuffer (s.Methode 1.1) aufgenommen und in einem 0.6%igen Agarose-Gel (TBE) elektrophoretisch analysiert.

16.2 Analyse von DNA aus Huhn-Calvaria

Für die Spaltung der eukaryotischen DNA mit Bal 31 wurden ca. 100 μg in 500 μl Bal 31-Puffer, mit 100 U Enzym, bei 30°C inkubiert. Da die Länge der isolierten Huhn-DNA mindestens 100 kb betrug (vgl.Abb.9A), sind in 100 μg höchstens 3.2 pmol DNA-Enden enthalten; nachdem sich das Verhältnis von 21 U Bal 31 : 0.7 pmol Enden (vgl.Methode 16.1) als günstig für eine gleichmäßige Spaltung erwiesen hatte, wurde die Enzymmenge von 100 U als ausreichend erachtet. Aliquote der Reaktion (50 μl) wurden stündlich entnommen, zu 1.5 μl 0.5 M EGTA gegeben (Endkonzentration: 15 mM), 5' bei 65°C erhitzt und in Eis gestellt. Jeweils 257.5 μl Ionenberichtigungs-Puffer (s.Methode 16.1) wurden zu der Bal 31-behandelter DNA zugesetzt, und die Ansätze wurden über Nacht bei -20°C eingefroren. Die DNA wurde dann mit jeweils 100 U Eco RI, für 4 Stunden, bei 37°C gespalten; zu den Ansätzen waren noch ca. 500 cpm radioaktives pBR322 (mit Pvu II gespalten und an den 3'-Enden markiert) hinzugesetzt worden, als Kontrolle für die Vollständigkeit der Eco RI-Spaltung. Die Reaktionen wurden wie in Methode 16.1 gestoppt, mit Äthanol präzipitiert und elektrophoretisch analysiert. Die DNA wurde auf Nitrozellulose transferiert (s.Methode 23.1) und mit nicktranslatierten, genomischen Subklonen (vgl.Resultate,7.3) hybridisiert.

17. DNA-Reinigung, Konzentration und Messung

17.1 Phenolextraktion von DNA

Zu der DNA-Lösung wurde ein gleiches Volumen Phenol (s. Puffer, Lösungen und Medien) pipettiert, und die zwei Phasen durch Schütteln gut durchmischt. Dazu wurde das doppelte Volumen Chloroform gegeben und ebenfalls gut gemischt. Die wässrige Phase wurde von der organischen durch Zentrifugation getrennt und abgezogen. Gewöhnlich wurde sie noch einmal nach der geschilderten Prozedur extrahiert. Anschließend wurde sie nur mit Chloroform gemischt und davon durch Zentrifugation getrennt. Phenolreste wurden mit Äther ausgeschüttelt.

17.2 DNA-Reinigung über Elutip-d

Die Ionenstärke der DNA-Lösung wurde an den LS-Puffer (0.2 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA) angeglichen. Bei geringen Volumina (bis zu 200 µl) wurde dies durch Zugabe zur DNA-Lösung von 2 ml LS-Puffer erreicht; bei größeren Volumina, bzw. bei hoher Salzkonzentration wurde die DNA zuerst durch Äthanol gefällt und in 2 ml LS-Puffer aufgenommen. Die Elutip-d Säule (Schleicher und Schuell) wurde auf eine 5 ml-Spritze aufgesetzt und mit 2 ml HS-Puffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA) gewaschen. Zwischen Säule und Spritze wurde ein Zellulose-Azetat-Filter (Durchmesser: 0.45 µm) angepaßt, und die Säule wurde mit 3 ml LS-Puffer äquilibriert. Die DNA-Lösung (absolute DNA-Menge: bis zu 100 µg) wurde unter leichtem Druck durch die Säule gegeben (Dauer: ca. 10'), und die Säule wurde mit 4 ml LS-Puffer gewaschen. Der Filter wurde abgenommen, und die DNA wurde zweimal mit jeweils 400 µl HS-Puffer eluiert. Zu den Eluaten wurde jeweils 1 ml absoluter Äthanol gegeben und gut durchmischt. Nach 15' bei -80°C wurde die DNA durch Zentrifugation präzipitiert, mit 70% Äthanol in Wasser gewaschen und in TE aufgenommen. Diese Methode hatte sich besonders in den Fällen bewährt, in denen weitere Behandlung der DNA mit Enzymen inhibiert war (z.B. Ligation nach Fragmentisolierungen aus Agarose, vgl. Methode 10.2). Bis zu 1 µg DNA verläuft die Reinigung praktisch verlustfrei.

17.3 Äthanol-fällung von DNA

DNA-Lösungen mit einer Konzentration von weniger als 10 µg/ml wurden vor der Fällung mit 10 mM MgSO₄ und 100 µg/ml tRNA aus E.coli versetzt. 0.3 M Natriumazetat, pH 7.0, und 2.5 Volumina Äthanol wurden zugesetzt und gut

gemischt. Die Lösung wurde entweder 15' bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gehalten und die DNA bei 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Äthanol in Wasser gewaschen; anschließend wurde es in den jeweiligen Puffer, je nach weiterer Verwendung, oder in TE (0.5 - 1 mg/ml) aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

17.4 Messung der DNA Konzentration

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde die DNA-Lösung mit TE-Puffer verdünnt und die OD bei 260 und 280 nm in einer Quarz-Küvette (Dicke = 1 cm) bestimmt; bei einem Verhältnis von 260 nm : 280 nm wie 2 : 1 (proteinfreie Lösung) wurde die Konzentration (in $\mu\text{g/ml}$) der Ausgangslösung nach

$$\text{DNA-Konzentration} = 46.7 \times \text{OD}_{260}\text{-Wert} \times \text{Verdünnung}$$

errechnet. Da RNA-Fragmente und Nukleotide in der DNA-Lösung diese Bestimmung stören (179), wurde die DNA-Menge auch nach Vergleich mit der Fluoreszenz eines DNA-Standards nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung abgeschätzt.

PRÄPARATION UND ANALYSE VON RNA

18. RNA-Extraktion aus Huhn-Geweben und Kulturzellen

Huhn-Calvaria wurden wie in Methode 8.1 beschrieben isoliert. Das Hirn wurde im offenen Schädel dicht am Übergang zum Rückenmark und hinter den Augen mit einem spitzen Skalpell abgeschnitten und herausgeholt. Sterna wurden, nach Freilegung des Thorax, mit den Rippen ausgeschnitten und dann von Muskeln und Knochen mit dem Skalpell befreit. Die Leber wurde isoliert und so gut wie möglich von Gefäßen befreit. Die langen Röhrenknochen der unteren Extremitäten wurden herausgeholt, und der Schaft wurde von den Gelenkendigungen abgetrennt. Jedes isolierte Stück wurde kurz in PBS gewaschen und sofort in Guanidinium-Puffer gegeben (8 M Guanidinium-HCl, 10 mM Natriumazetat, pH 5.0, 1mM DTT, 2 mM EDTA). Von primären Embryofibroblasten-Kulturen wurde das Medium (Dulbecco's Modified Eagle, Biochrom, mit 10% fötalem Kälberserum) entfernt, die Zellschicht wurde 2x mit PBS gewaschen, mit 3 ml/Platte Trypsinlösung (0.1% Trypsin in PBS + 1 mM EDTA) überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert (ca. 5', Mikroskopkontrolle). Das Trypsin wurde durch Zugabe von 7 ml Medium pro Platte gestoppt, die Zellen wurden in ein Plastikröhrchen pipettiert und für 5', bei RT, mit 1000 rpm zentrifugiert (Zimmerzentrifuge). Das Zellpräzipitat wurde

in 10 ml PBS resuspendiert, nocheinmal zentrifugiert und in Guanidinium-Puffer aufgenommen. Alle Zell- bzw. Gewebesuspensionen waren nicht mehr als 20% (Gewicht/Volumen Guanidinium-Puffer). Die RNA-Extraktion war nach (185), modifiziert; sie wird hier exemplarisch für *Sterna* beschrieben: Die Suspension (5 g *Sterna*, ca. 400 Stück, in 40 ml Puffer) wurde in einen Potter gegeben und gut homogenisiert (10 - 20 Passagen mit dem Pistill). Unlösliche Reste wurden abzentrifugiert (10', 4°C, 5000 rpm). Der Überstand wurde mit 1/2 Volumen (20 ml) Äthanol versetzt, 30' bei -20°C gehalten und für 30', bei 4°C mit 5000 rpm abzentrifugiert. Das Nukleinsäurepellet wurde in 10 ml Guanidinium-Puffer aufgenommen und die Äthanolzugabe und Präzipitation wurden dreimal wiederholt. Das Pellet wurde dann in 5 ml 20 mM EDTA, pH 7.5, aufgenommen und für 1', bei 4°C, mit 2000 rpm zentrifugiert; der Überstand wurde abgenommen und kalt aufbewahrt (Überstand "a"). Das Pellet wurde in 2.5 ml 20 mM EDTA, pH 7.5, aufgenommen und für 5', bei 4°C, mit 2000 rpm zentrifugiert; der Überstand wurde aufbewahrt (Überstand "b"). Der letzte Schritt wurde wiederholt (Überstand "c"). Die Überstände a, b und c wurden jeweils mit 1 Volumen Chloroform + i-Butanol (im Verhältnis 4 : 1) gemischt und 5', bei 4°C, mit 5000 rpm zentrifugiert. Die wässrigen Phasen (10 ml) wurden vereinigt, und es wurden 30 ml 4 M Natriumazetat, pH 5.0, dazupipettiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei -15°C gehalten und dann 1 Stunde, bei 4°C, mit 4000 rpm zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde zuerst mit 3 ml kaltem 3 M Natriumazetat, pH 5.0, dann mit 80% Äthanol in Wasser gewaschen (Präzipitation: 15', 4°C, 4000 rpm) und in autoklaviertem, doppeltdestilliertem H₂O aufgelöst. Die Lösung wurde mit 0.3 M Natriumazetat, pH 7.0, versetzt, und 2.5 Volumina Äthanol wurden beigemischt; nach 30' bei -80°C, oder über Nacht bei -20°C wurde die Suspension 1 Stunde, bei 4°C, mit 5000 rpm zentrifugiert, das RNA-Pellet mit 80% Äthanol in Wasser gewaschen und wieder in Wasser, mit einer Konzentration von 1 mg/ml, aufgelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute war 4.5 - 5 mg Total-RNA. Die RNA-Qualität wurde mit einem Quecksilbergel analysiert (s.Methode 1.3).

19. Oligo-dT-Zellulose-Chromatographie von Huhn-RNA

1 ml mit Wasser äquilibrierte Oligo-dT-Matrix (Type 3, Collaborative Research, Inc.) wurde in eine 3 x 0.5 cm Säule gepackt und mit 5 ml 0.1 M NaOH gewaschen. Die Natronlauge wurde mit 10 ml doppeltdestilliertem, autoklaviertem Wasser gewegewaschen. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml HS-Puffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.2% Sarcosyl) äquilibriert. 1.2 mg Total-RNA aus Huhn-Calvaria (in 200 µl Wasser) wurde an den LS-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.2% Sarcosyl) angeglichen (Endvolumen: 3 ml), 3' bei 65°C erhitzt und ins

Eis abgestellt. 0.5 M NaCl wurden zur RNA gegeben, womit diese jetzt im HS-Puffer vorlag. Die RNA-Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und mit 1 Tropfen/5 sec chromatographiert ("Durchfluß"). Der Durchfluß wurde aufgefangen und noch einmal über die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 ml HS-Puffer gewaschen ("Wasch"). Die RNA wurde mit 6 x 0.5 ml LS-Puffer eluiert. Der Durchfluß, der Wasch und das Eluat wurden mit Äthanol gefällt, wobei nur zum Eluat 0.3 M Natriumazetat gegeben wurden. Das RNA-Präzipitat wurde zentrifugiert (1 Stunde, bei 4°C, mit 6000 rpm in der Zimmerzentrifuge) und mit 70% Äthanol in Wasser gewaschen. Jede der drei Fraktionen wurde im ursprünglichen Volumen Wasser (200 µl) aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Aliquote davon wurden in einem Agarose/Hg Gel elektrophoretisch analysiert, wobei festgestellt wurde, daß sich die Hauptmenge der RNA (ca. 90%) im Durchfluß befand. Gleiche Volumina der drei Fraktionen wurden dann im Northern-Blot für C550-komplementäre Sequenzen analysiert (s. Abb. 20); mehr als 95% der C550-RNAs befanden sich im Eluat. Daher wurde der Anreicherungsfaktor der C550-RNAs mit dieser Methode auf mindestens 10 geschätzt.

20. RNase-Abbau von RNA

30 µg Total-RNA aus 12 Tage alten Huhn-Calvaria wurden mit 10 µg/ml DNase-freie RNase A in 50 µl TE-Puffer für 30', bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dafür, daß während der Inkubation keine DNasen aktiv waren, wurde in den Ansatz noch eine radioaktive DNA-Probe eingeschlossen (pC550, mit Bam HI und Pvu II gespalten, und an den 3'-Enden radioaktiv markiert). Der Ansatz wurde mit Phenol extrahiert, mit 15 µg tRNA aus E.coli versetzt und mit Äthanol gefällt. Das Pellet wurde in 20 µl Wasser aufgenommen und über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurde es für den Northern-Transfer vorbereitet (s. Methode 23.4).

21. RNA-Bestimmung

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte - wie für die DNA - durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm (s. Methode 17.4) nach

$$\text{RNA-Konzentration} = 40 \times \text{OD}_{260}\text{-Wert} \times \text{Verdünnung}$$

(in µg/ml). Der errechnete Wert wurde mit der RNA-Fluoreszenz in einem Hg-Gel verglichen (vgl. Methode 1.3). Die Intaktheit von Total-RNA (definiert durch ein Massenverhältnis von 28S zu 18S wie von 2 zu 1) wurde ebenso durch elektrophoretische Analyse in Hg-Agarosegel kontrolliert.

NUKLEINSÄUREHYBRIDISIERUNGEN

22. DNA/RNA-Hybridisierung in Flüssigkeit

22.1 S1 Nuklease-Spaltungen (Berk und Sharp-Technik)

Linearisiertes pC550-Plasmid und RNA (Total-RNA aus verschiedenen Huhngeweben bzw. tRNA aus E.coli als negative Kontrolle) wurden für die Spaltungen mit der S1-Nuklease in Flüssigkeit hybridisiert. Der Vorgang wird exemplarisch für das Initialexperiment zur cDNA/RNA-Kolinearität (s. Resultate, 1.) beschrieben. Jeweils 10 µg CsCl-gereinigtes, nukleasefreies pC550-Plasmid wurde mit Hin dIII bzw. Bam HI vollständig gespalten, mit Phenol extrahiert, mit Äthanol präzipitiert und nach Aufnahme in 50 µl Tris-Cl, pH 8.0, an den 5'-Enden mit CIP wie beschrieben (Methode 11.) dephosphoryliert. Jeweils 1 µg dieser DNA (0.7 pmol Enden) wurden mit 7 pmol γ -³²P-ATP an den 5'-Enden radioaktiv markiert und über Sephadex-G 50 gereinigt (s. Methode 13.1). 150000 cpm der DNAs (in 0.1xTE) wurden mit jeweils 10 µg Huhn-Sterna Total-RNA bzw. E.coli tRNA (in Wasser) vereinigt, gut gemischt und mit Äthanol präzipitiert. (Da bei der Präzipitation oft Verluste entstehen, wurden die Nukleinsäuren bei späteren Experimenten stattdessen - ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse - lyophilisiert.) Das Präzipitat wurde in 20 µl 80% Formamid, 0.04 M PIPES, pH 6.4 mit NaOH, 1 mM EDTA, 0.4 M NaCl gelöst (164) und in eine silikonisierte Glaskapillare aufgenommen. Die Enden der Kapillare wurden zugeschmolzen, und die Nukleinsäuren wurden 15', bei 75°C (Wasserbad) denaturiert. Die Temperatur des Wasserbads wurde mit Eis innerhalb von 1' auf 50°C gebracht, und die Proben wurden bei dieser Temperatur für 4 Stunden belassen. Nach dieser Zeit wurden die Kapillaren rasch auf 0°C abgekühlt, aufgebrochen und ihr Inhalt in 200 µl S1-Puffer geleert. 100 U S1-Nuklease (Boehringer) wurden zu jedem Ansatz gegeben, und es wurde bei 30°C 1 bzw. 2 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA und 10 µg tRNA aus E.coli gestoppt. Die Nukleinsäuren wurden mit Äthanol gefällt und in Auftragspuffer (Agarose/TBE) aufgenommen. Die Spaltungsprodukte wurden in einem 1%igen Agarosegel in TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und exponiert.

In Parallelansätzen wurde untersucht, welchen Effekt die Hybridisierung bei anderen Temperaturen, Zugabe von mehr Enzym bzw. Inkubation bei höheren Temperaturen haben: Hybridisierung bei 45°C führt ebenfalls zu der 550 bp lange Bande, gleicher Intensität; keine unspezifische Hybridisierung wurde bei dieser Temperatur beobachtet. Bei 55 bzw. 60°C bildet sich kein spezifisches Hybrid (kein Nukleasen-schutz). Zugabe von 1000 bzw. 2000 U S1-Nuklease zu den

Ansätzen, oder Inkubation bei 20, 37 bzw 45°C beeinflusst weder die Länge noch die Intensität der geschützten Bande, sondern nur die Geschwindigkeit der Ausbildung. Für alle weiteren S1 Nuklease-Experimente wurden deshalb die Nukleinsäuren bei 50°C hybridisiert, und für 30', mit 2000 U Enzym, bei 30°C verdaut.

Nach dem gleichen Verfahren wurden auch die Hybridisierungen des 5'markierten pC550/Bam HI-Plasmids (jeweils 150000 cpm) mit den Total-RNAs (jeweils 10 µg) aus verschiedenen Geweben des Huhns vorgenommen (vgl.Resultate, 3.); ebenso die Ermittlung der Sättigungsmenge (vgl.Resultate, 2.), wobei hier die Huhn-RNA 20 µg betrug, und die DNA-Menge zwischen 5000 und 150000 cpm variiert wurde; und schließlich auch die Ermittlung der Proportionalität zwischen eingesetzter Sterna-RNA und geschützter C550-DNA (vgl.Resultate, 2.). Bei Letzterem wurde die DNA-Menge (im Sättigungsbereich) konstant gehalten (250000 cpm), und die Huhn-RNA-Menge variiert (0.5 - 100 µg), wobei die *gesamte* RNA-Menge pro Ansatz ebenfalls durch Zugabe von E.coli-tRNA konstant war (100 µg). (Für die Berechnung der C550-Molekül-anzahl s.Methode 34.) Für die S1 Nuklease-Experimente, die in den Resultaten, 8., beschrieben werden, wurde das pC550-Plasmid entweder (a): mit Hin dIII gespalten, an den 3'-Enden mit α -³²P-dATP und Klenow-Polymerase markiert (s.Methode 13.3), und 150000 cpm davon wurden für die Hybridisierung mit 10 µg Huhn-Sterna Total-RNA eingesetzt; oder (b): es wurde in vivo mit ³²P markiert und gereinigt (vgl.Methode 14), mit Bam HI gespalten, und 200000 cpm wurden mit 50 µg Huhn-Sterna Total-RNA hybridisiert.

22.2 RNase H Spaltungen

Obwohl Hybridisierung von linearem pC550 mit Total-RNA aus Huhn für die Spaltung mit RNase H (s.Resultate, 10.) durchaus möglich gewesen ist, ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig, weil das Plasmid (5.6 kb) und der Restteil der einen C550-RNA (4.7 kb) mit der 28S rRNA in der Northern-Analyse interferieren. Aus diesem Grund wurde das eukaryotische Hin dIII - Bam HI Insert aus pC550 isoliert (s.Methode 10.2) und RNA aus Huhn-Calvaria wurde an PolyA(+) RNA durch Oligo-dT Zellulosechromatographie ca. um den Faktor 10 angereichert (s.Methode 19.). Für jeden RNase H-Ansatz wurden 5 ng C550-Insert mit 1.5 µg PolyA(+) RNA aus Calvaria und 10 µg tRNA aus E.coli vereinigt (errechnetes molares Verhältnis von DNA : C550-RNA wie 10 : 1), lyophilisiert, und wie in Methode 22.1 für die S1 Nuklease-Experimente beschrieben (in Formamidpuffer, bei 50°C) hybridisiert. Die Negativkontrollen wurden zwar in Formamidpuffer aufgenommen, für die Zeit der Hybridisierung aber auf Eis belassen. Der Inhalt von allen Kapillaren wurde dann zu 80 µl 0.3 M Natriumazetat, pH 7.0, gegeben, und die Nukleinsäuren mit 250 µl Äthanol gefällt. Das Präzipitat wurde 2x mit 70% Äthanol in Wasser gewaschen und in 195 µl

RNase H-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.13 M NH_4Cl , 10 mM Mg-Azetat, 5% Saccharose) aufgelöst. 5 μl (1 $\bar{0}$) RNase H (ENZO) wurde dazupipettiert, und die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 mM EDTA gestoppt, mit Phenol extrahiert und mit Äthanol präzipitiert. Die Pellets wurden dann in Glyoxalpuffer aufgenommen und für den Northern-Transfer vorbereitet (s.Methode 23.4).

23. Transfer und Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Membranen

23.1 DNA-Transfer von-Agarosegelen auf Nitrozellulose ("Southern-Blot")

Genomische Huhn-DNA, die mit Bal 31 und Eco RI gespalten wurde (s.Resultate, 7.3), wurde, nach der Elektrophorese im Agarosegel (TBE) und der Ethidiumbromid-Färbung, fotografiert und auf Nitrozellulose-Papier nach der von Southern beschriebenen Methode (241) transferiert. Dazu wurde das Gel (0.3 cm dick) 20' in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl gelegt, 2x 20' mit 0.5 M Tris-Cl, pH 7.0, 3 M NaCl neutralisiert und 10' in 20xSSC gewaschen. Das Gel wurde blasenfrei auf ein 3MM-Papier gelegt, das mit 20xSSC getränkt war und in 20xSSC tauchte. Ein Nitrozellulose-Filter (Schleicher und Schuell, Poren: 0.45 μm), gleicher Dimensionen wie das Gel, wurde in 2xSSC getaucht und auf das Gel gelegt. Einige mit 2xSSC getränkte 3MM-Blätter und viele Lagen trockene, saugfähige Papierhandtücher wurden darauf gelegt und mit eine Plexiglasscheibe beschwert. Der Transfer der DNA vom Gel auf den Nitrozellulose-Filter erfolgte über Nacht. Der Filter wurde kurz in 2xSSC gelegt, luftgetrocknet und 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken.

Doppelsträngige DNA konnte auch nach der für RNA beschriebene Technik (Glyoxaldenaturierung, s.Methode 23.4) für andere Zwecke auf Gene-Screen erfolgreich transferiert werden. Dagegen lieferte die Geltrocknungsmethode (242) in unseren Händen unbefriedigende Ergebnisse (zu hoher Hintergrund bei der anschließenden Hybridisierung).

23.2 DNA-Transfer von E.coli-Kolonien auf Nitrozellulose (nach Grunstein und Hogness)

Die Identifizierung von einigen genomischen Subklonen, wie z.B. von pCA-3.8-r und pCA-3.8-l (vgl.Resultate, 6.4, und Abb.16), erfolgte durch in situ Hybridisierung mit nicktranslatierter, genomischer DNA. Der erste Schritt dafür war die Immobilisierung der Transformanten-DNA auf Nitrozellulose nach der Methode von Grunstein und Hogness

(243). Dazu wurde das Muster der über Nacht gewachsenen Transformanten (s. Methode 12.7) auf sterilen Samt, und davon zweimal auf sterile Nitrozellulose-Filter (Millipore) übertragen, die auf LB Agar+Amvizillin (50 µg/ml) lagen. Nach über Nacht Inkubation der Sekundärplatten bei 37°C (Kolonien Durchmesser: 0.5 - 1 mm) erfolgte die DNA-Immobilisierung durch folgende Schritte (da es sich um pUC-Derivate handelte war eine Chloramphenicol-Amplifikation nicht notwendig, s. Referenzen in (183)): Die Filter wurden jeweils 7' auf 0.5 M NaOH, 2x 1' auf 1 M Tris-Cl, pH 7.5, 6' auf 0.5 M Tris-Cl, pH 7.5, 1.5 M NaCl gelegt und anschließend nacheinander in absolutem Äthanol und in 0.3 M NaCl-Lösung gespült. Sie wurden dann zwischen zwei 3MM-Papierstücke kräftig gepreßt, luftgetrocknet und 3 Stunden in Vacuum gebacken.

23.3 DNA-Transfer von Phagenplaques auf Nitrozellulose

Für das screening der Calvaria-Genbank, sowie auch für die Reinigung der identifizierten Phagenklone, wurde die Phagen-DNA von den Plaques auf Nitrozellulose übertragen: Nach Abkühlen der bei 32°C inkubierten Agarplatten auf 4°C wurde auf die obere M-Agarose-Schicht ein (trockener) Nitrozellulose-Filter (Millipore) gelegt und für 20' bei RT liegengelassen. Der Filter wurde abgenommen und ein zweiter Filter wurde diesmal für 40' auf die Plaques gegeben. Alle weiteren Handlungen wurden mit der Phagen-DNA auf der Oberseite der Filter durchgeführt. Die zwei Filterserien wurden luftgetrocknet (ca. 1 Stunde bei RT). Anschließend wurden sie sequenziell für jeweils 10 sec auf Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl), Neutralisationspuffer (0.4 M Tris-Cl, pH 7.5, 2xSSC) und 2xSSC gelegt. Die Filter wurden luftgetrocknet und 2 Stunden, bei 80°C in Vacuum gebacken.

23.4 RNA-Transfer von Agarose-Gelen auf Gene-Screen ("Northern-Blot")

Die Technik des Northern-Blots (215) für Transfer und Immobilisierung von RNA auf einer festen Unterlage war eine Kombination der Methode nach (244) (RNA-Denaturierung und Gelelektrophorese) und nach dem empfohlenen Transfer-Protokoll von Gene-Screen. Die RNA-Proben (bis zu 10 µg) und der DNA-Marker (zusammen mit 10 µg tRNA aus E.coli) wurden lyophilisiert bzw. mit Äthanol gefällt und in 8 µl Glyoxal-Puffer (1 M Glyoxal, 50% DMSO, 10 mM Na-Phosphat, pH 7.0) aufgelöst. Die Nukleinsäuren wurden dann 1 Stunde, bei 50°C denaturiert und in Eis auf 0°C abgekühlt. 2 µl Auftragspuffer (5xkonzentriert, dh.: 50% Glyzerin, 10 mM Na-Phosphat, pH 7.0, 0.125% BPB, 0.125% XC) wurden dazu gegeben, und die Lösung wurde auf ein horizontales 1.1% Agarose-Gel (10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0), mit den

Dimensionen $20 \times 14 \times 0.3 \text{ cm}^3$, aufgetragen. Das Gel tauchte 0.3 cm unter der Pufferoberfläche. Die Elektrophorese wurde bei 90 V/45 mA für 6 Stunden unter Pufferzirkulation (zur Einhaltung des pH-Wertes) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wandert der BPB-Marker $16 - 17 \text{ cm}$. Das Gel wurde kurz in $10 \text{ mM Na-Phosphat, pH } 7.0$, gewaschen und für den Transfer vorbereitet. Dazu wurde eine Gene-Screen-Membran, gleicher Fläche wie das Gel, $20'$ in $10 \text{ mM Na-Phosphat, pH } 7.0$, getränkt und auf das Gel gelegt. Das Gel wurde noch auf beiden Seiten mit jeweils 2 Blättern 3MM -Papier, einem Kunststoff-Schwamm (letztere mit $10 \text{ mM Na-Phosphat, pH } 7.0$, äquilibriert) und Plastik-Haltern versehen und in die Transferkammer getaucht; sie enthielt ebenfalls $3 \text{ l } 10 \text{ mM Na-Phosphat, pH } 7.0$. Die Gene-Screen-Membran war auf der Seite der Anode. Der Transfer der Nukleinsäuren erfolgte unter Rühren des Puffers bei 4°C ; die Stromstärke war 0.3 A für 2 Stunden und $0.6 - 0.7 \text{ A}$ über Nacht. Die Membran wurde dann kurz in $10 \text{ mM Na-Phosphat, pH } 7.0$, geschwenkt, luftgetrocknet und 2 Stunden , bei 80°C gebacken (kein Vakuum nötig).

Bei Bedarf konnte die RNA nach der Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel $20'$ in 50 mM NaOH geschüttelt und $2 \times 10'$ mit $2 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in $2 \text{ M Natriumazetat, pH } 5.0$, gefärbt. Die RNA-Fluoreszenz im UV-Licht ist vergleichbar mit derjenigen der Agarose/Quecksilber-Gele (vgl. Methode 1.3). Gele, wovon die RNA transferiert werden sollte, wurden nicht gefärbt (244); ein erfolgreicher Transfer konnte jedoch durch "UV-shadowing" der Gene-Screen-Membran festgestellt werden.

RNA konnte von Na-Phosphat-Gelen auch nach der Kapillartechnik (s. Methode 23.1 und (244)) auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell) mit der gleichen Effizienz übertragen werden, wobei aber die anschließende Hybridisierung (s. Methode 24) erhöhten Hintergrund ergab. Kochen der Membran zur Entfernung von restlichem Glyoxal (245) war in unseren Händen ohne Effekt bzw. nicht notwendig.

24. Nukleinsäuren-Hybridisierung auf Membranen

DNAs bzw. RNAs, die auf Membrane transferiert worden waren (s. Methoden 23.1 bis 23.4), wurden ausnahmslos nach der "Sarkosyl-Technik" (beschrieben in (246)) mit nick-translatierter DNA hybridisiert. Dazu wurden die Membrane (bis zu 5 Blättern) mit $5 \times \text{SSC}$, 1% Sarkosyl (Ciba) (Volumen: ausreichend zur vollständigen Befeuchtung, gewöhnlich $5 - 10 \text{ ml}$) in eine Plastikfolie eingeschweißt und 1 Stunde , bei 65°C vorhybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die nick-translatierte DNA (in $0.1 \times$, bzw. $1 \times \text{TE-Puffer}$, s. Methode 1.1) $10'$, bei 95°C denaturiert und in $2 - 5 \text{ ml}$ gekältem Hybridisierungspuffer ($5 \times \text{SSC}$, 1% Sarkosyl) gegeben. $40000 \text{ cpm pro cm}^2$ Membranfläche wurden grundsätzlich

eingesetzt. Die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen, und der Hybridisierungspuffer mit der radioaktiven DNA wurde zu der Membran gegeben. Es wurde für 24 Stunden, bei 65°C bei leichtem Schütteln hybridisiert. Die Membran wurde dann zweimal 30', bei 65°C, mit jeweils 1 l 3xSSC, 0.5% Sarkosyl, und anschließend ebenso mit 3xSSC gewaschen. Die Membranen wurden luftgetrocknet und exponiert.

Der Vergleich der Sarkosyl- mit der Formamid/Denhardt-Technik (247) hat ergeben, daß die erste mindestens so spezifisch und 5 - 10x sensitiver ist (eigene Ergebnisse, nicht gezeigt). Zusatz von einzelsträngiger DNA zum Hybridisierungsmix ist nicht notwendig. Bei zu hohem Hintergrund kann die Membran zusätzlich 1 Stunde, bei 70°C, mit 0.1xSSC, 0.1% Sarkosyl gewaschen werden. (Dies war z.B. bei der Southern-Hybridisierung der mit Bal 31 und Eco RI behandelte genomischen DNA notwendig, vgl. Resultate, 7.3, und Abb.19). Nach einer solchen Waschung wurde das Verschwinden eines *positiven* Signals nie beobachtet. Die Membranen wurden grundsätzlich nicht wiederverwendet.

PRÄPARATION UND ANALYSE VON PROTEINEN

25. Proteinextraktionen

25.1 Isolierung der pFP1- bzw. pFP2-Polypeptide aus E.coli

Vorkulturen der Stämme, welche die rekombinanten Plasmide enthalten, wurden angefertigt: JM 83(pFP1) wurde in LB + 100 µg/ml Ampizillin, F'11recA(pFP2) in LB + 10 µg/ml Tetrazyklin angeimpft und über Nacht bei 37°C, mit 160 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden 1 : 100 in jeweils 2 l Medium (wie oben; Unterschied: Bei F'11recA(pFP2) enthielt das Medium noch 1 mM IPTG) verdünnt und wie oben inkubiert. Nach ca. 16 Stunden war die gemessene β Galaktosidase-Aktivität in den Kulturen maximal. Die Fusionspeptide wurden nach (268), modifiziert, isoliert. Dazu wurden die Zellen präzipitiert (10', bei 4°C, mit 5000 rpm in der Sorvallzentrifuge), in 500 ml 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, aufgenommen und noch einmal wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 20 ml B-Puffer resuspendiert, und 10 mM β -Merkaptoäthanol und 0.3% Antifoam A wurden dazugegeben. Die Zellen konnten auf dieser Stufe bei -20°C für mehrere Wochen, ohne Aktivitätsverluste, aufbewahrt werden. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschallbehandlung; es wurde 10 sec beschallt und 20 sec in Eis abgekühlt, mit einer Gesamtdauer der Beschallung von 2 Minuten. Der Extrakt wurde von unlöslichen Resten durch Zentrifugation (20', bei 4°C, mit 25000 rpm im SW 28 Rotor der Beckmann-Ultrazentrifuge)

befreit. Der Zytosol-Überstand wurde dann über eine pAPTG-Sepharose Säule (Sigma, ca. 5 ml Matrixvolumen äquiliбриert mit B-Puffer + 10 mM β -Merkaptoäthanol) gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 ml B-Puffer + 50 mM β Merkaptoäthanol gewaschen. Die Fusionsproteine wurden mit 50 ml 0.1 M Na-Borat, pH 10.05, 10 mM β -Merkaptoäthanol eluiert. Die Geschwindigkeit der Säulenpassagen betrug grundsätzlich 1 ml/Minute. Der Proteingehalt und die β Galaktosidase-Aktivität aller Fraktionen (0.8 ml) wurden bestimmt, und die Fraktionen um den Aktivitäts-peak wurden vereinigt.

Für einige Zwecke (Gelanalyse, 2D-Elektrophorese, Immundiffusion) konnte der Aktivitätspool direkt verwendet werden; nötige schnelle Volumenreduktion konnte durch Ultrafiltration mit Centricon 30 (Amicon) erbracht werden: Der Pool wurde in den Proben-Behälter pipettiert (maximal 2 ml) und bei 4°C, mit 5000 rpm im SS34-Festwinkelrotor (Sorvall) bis zum gewünschten Volumen zentrifugiert (ca. 2 Stunden für die Einengung von 2 auf 0.2 ml). Die konzentrierte Lösung wurde dann in den Retentat-Behälter durch Zentrifugation wie oben (1') gesammelt. Die Ausbeute, gemessen an der Enzym-Aktivität, war >80%.

Für die Immunisierung und die Dauerlagerung wurde wie folgt verfahren: Der pH-Wert des Aktivitäts-pools wurde unter Rühren durch vorsichtige Zugabe von 0.5 M Essigsäure auf 7.0 - 7.5 gebracht (Kontrolle mit pH-Indikatorpapier); 90 - 95% der Aktivität bleiben nach der pH-Einstellung übrig. Folgende Proteaseinhibitoren wurden zum Aktivitätspool dazupipettiert: 20 μ g/ml PMSF (gelöst in Aceton) 2.5 mM NEM, 0.5% Aprotinin und 10 mM von EDTA, EGTA, ϵ -Aminokapronsäure und Benzamidiniumhydrochlorid; keine dieser Substanzen beeinträchtigt die enzymatische Aktivität; EDTA inhibiert die Aktivität reversibel. Der Pool wurde in zwei gleiche Teile geteilt; zu der einen Hälfte wurde in der Dauer von 2 Stunden unter Rühren im Kühlraum 0.35 g/ml festes Ammoniumsulfat langsam gegeben (50% Sättigung); nach weiterem Rühren über Nacht wurde die Suspension bei 4°C aufbewahrt. Zur zweiten Hälfte wurde 6 M festes Guanidinium-HCl (Endkonzentration) und 10 mM DTT gegeben, und die Lösung wurde über Nacht bei RT rotieren gelassen. 30 mM Jodazetamid wurde dann noch dazu gegeben, und es wurde für weitere 2 Stunden im Dunkeln rotiert. Diese Lösung wurde anschließend gegen 10 mM Ammoniumhydrogenkarbonat ausgiebig dialysiert, die Dialysatsuspension wurde lyophilisiert, die Proteine in einer Konzentration von $\geq$ 0.25 mg ursprüngliche β Galaktosidase-Äquivalente pro ml PBS + Inhibitoren (s.oben) suspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Es ist versucht worden, die Ausbeute der pFP2-Fusionspeptide durch Bakterienwachstum in Minimalmedium mit Glycerin bzw. Sukzinat + Zitrat zu erhöhen; im Gegensatz zu den berichteten Ergebnissen mit Wildtyp- β Galaktosidase (297), war es jedoch weder mit CSH 50(pFP2) noch mit F'11recA(pFP2) möglich, eine Steigerung der Produktion zu erzielen. Der

limitierende Faktor ist hier wahrscheinlich, wie auch für die ungleiche Produktion der a, b, d und f Peptide (vgl. Resultate, 17., 18.), der ungünstige Kodon-Gebrauch im eukaryotischen Teil.

26. Proteinextraktion aus Huhn-Gewebe und Kollagenase-Abbau

Calvaria, Sterna, Leber und Hirn wurden wie in Methode 18. beschrieben isoliert; Huhn-Herzen wurden ebenso wie die Leber von Gefäßen weitgehend befreit; für die Sehnen-Isolierung wurden die Krallen der unteren Extremitäten einzeln mit einer Pinzette festgehalten und abgezogen; die mitgezogenen Sehnen wurden dann von den Krallen am leichtesten unter PBS mit einem Skalpell abgetrennt. Alle Gewebe wurden in PBS gewaschen und in Guanidinium-Puffer (6 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 3 µg/ml PMSF, 10 µM 4-(Chlormercuri)-Benzoessäure, 0.1 M ε-Aminokapronsäure, 10 mM EDTA, 5 mM Benzamidiniumhydrochlorid, 10 mM NEM) als 20%ige Suspension aufgenommen. Sie wurden sofort mit einem Polytron-Mixer homogenisiert und bei 4°C aufbewahrt.

Für den Kollagenase-Abbau wurde ein Aliquot (5 ml) des Calvaria-Extraktes 24 Stunden gegen 5 l 0.2 M NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 20 µg/ml PMSF, 2.5 mM NEM dialysiert. Ca. 500 µg Protein vom Dialysat wurden mit 85 U bakterieller Kollagenase in 500 µl Kollagenase-Puffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 2.5 mM NEM) 90' bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Laemmli-Auftragspuffer (ohne Reduktionsmittel, s. Methode 1.7) gestoppt und bis zur Verwendung (s. unten) bei -20°C gehalten.

Für die Elektrophorese in PAA wurden die Guanidinium-Extrakte (jeweils 5 ml davon) entweder 24 Stunden gegen 5 l 1 M NH₄HCO₃, 20 µg/ml PMSF, 2.5 mM NEM dialysiert, oder mit Äthanol gefällt; für die letztere Prozedur wurde ein Aliquot mit 9 Volumina Äthanol versetzt, 6 Stunden bei 4°C gehalten, durch Zentrifugation (Eppendorf) präzipitiert und in PBS + 20 µg/ml PMSF, 2.5 mM NEM aufgenommen; die Präzipitation wurde wiederholt. Die Pellets wurden wie oben in nicht-reduzierenden Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Beide Behandlungen liefern gleiche Ergebnisse.

Für jeden Gellauf wurden ca. 50 µg Protein (beim Kollagenase-Abbau: ursprüngliche Masse) genommen; zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde in den jeweiligen Ansatz 1/10 Volumen β-Merkaptoäthanol gegeben (Endkonzentration: 1.4 M). Die Proben wurden erhitzt und im PAA-Gel nach Laemmli (s. Methode 1.7) analysiert.

27. Radioaktive Markierung von bakteriellen Polypeptiden

27.1 in vitro Markierung

Die in vitro Markierung der Polypeptide von pUC9, pFP1 und Derivaten wurde nach der Methode der gekoppelten Transkription und Translation von superzirkulären Plasmiden im zellfreien Extrakt durchgeführt (nach (267)). Im wesentlichen wurde das von Amersham empfohlene Protokoll befolgt: Lösung 1 (S-30 Extrakt) wurde auf Eis aufgetaut, 5', bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf), der Überstand in 5 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Für jede Reaktion wurden ein solches Aliquot (auf Eis) und die Lösungen 2, 3, 5 und 7 des Translations-Kits aufgetaut, und folgendes wurde in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert:

Mix I:

- Lösung 5 (Verdünnungs-Puffer) *)
- 1 µl frisch aufgelöstes 150 mM CAMP (Endkonzentration: 5 mM)
- 30 µCi ³⁵S-Methionin *)
- 1 µg superzirkuläre Plasmid-DNA *)

$$\Sigma_{Vol} = 13.5 \mu l$$

*) Diese Lösungen hatten zusammen ein Volumen von 12.5 µl. Wenn nötig, wurde die DNA lyophilisiert bzw. mit Äthanol präzipitiert. Es wurde gefunden, daß 1 µg DNA für die analysierten Plasmide die optimale Menge (für einen geringen Hintergrund) ist.

Mix II:

- 7.5 µl Lösung 2 (Reaktionszusätze) *)
- 3 µl Lösung 3 (Aminosäuren ohne Methionin) *)
- 1 µl 15 mM IPTG (Endkonzentration: 0.5 mM)
- 5 µl Lösung 1 (S-30 Extrakt)

$$\Sigma_{Vol} = 16.5 \mu l$$

*) Diese Lösungen wurden vor der Zugabe gut durchmischt.

Mix I wurde zu Mix II gegeben (Reaktionsvolumen: 30 µl), und der Ansatz wurde 1 Stunde, bei 37°C, unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Jeweils 5 µl Lösung 7 (nicht-radioaktives Methionin) wurden dann dazupipettiert, und es wurde weitere 10' bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 35 µl 2xAuftragspuffer (s.Methode 1.7) gestoppt und im PAA-Gel wie in Methode 1.7 beschrieben analysiert.

27.2 in vivo Markierung

Die Bakterienstämme F'llrecA(pFP2), F'llrecA(pMC1871) und C 600 waren über Nacht in LB Medium (37°C, 160 rpm) gewachsen (die plasmidhaltigen Stämme in Gegenwart von 10 µg/ml Tetrazyklin). Die radioaktive Markierung der Proteine wurde nach (248) durchgeführt. 1 ml der über Nacht Kulturen wurde abgenommen, abzentrifugiert (1', RT, Eppendorf), mit TE-Puffer gewaschen, in 100 ml supplementiertes, Schwefel-limitiertes M9 Medium (0.1 mM CaCl₂, 0.3 mM MgSO₄, 0.7 mM MgCl₂, M9 Salze, 0.4% Glycerin, jeweils 80 µg/ml von allen physiologischen L-Aminosäuren außer Methionin, 1 µg/ml Biotin, 10 µg/ml Thiamin, jeweils 20 µg/ml von Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin und Thymidin, 1 mM IPTG) und Tetrazyklin (wie oben) gegeben und bei 37°C, bis zu einer OD₆₀₀ = 0.6 - 0.7, mit 160 rpm geschüttelt. 1 ml davon wurde abgenommen, zu 100 µl S-Methionin gegeben und 1 Stunde weitergeschüttelt. (Unter diesen Bedingungen befinden sich in der 1 ml-Suspension ca. 0.5 µg β Galaktosidase-Äquivalente.) Die Zellen wurden dann auf Eis gestellt, abzentrifugiert (5', 4°C, 5000 rpm in der Zentrifuge) und in 0.5 ml TE-Puffer aufgenommen. 0.5 ml Trägerzellen (10x konzentrierte F'llrecA(pMC1871) Zellen, die im gleichen Medium, ohne radioaktives Methionin bis zur Sättigung gewachsen waren) wurden dazupipettiert, die Suspension wurde wie oben abzentrifugiert, und das Pellet entweder sofort weiter verarbeitet (s. Methode 33) oder bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

28. Bestimmung der β Galaktosidase-Aktivität

28.1 Von intakten Zellen

Die Aktivität wurde nach (266), modifiziert, gemessen: 1 ml der Bakterienkultur wurde 1' zentrifugiert (Eppendorf), und das Bakterienpellet in 1 ml Z-Puffer aufgenommen. Je nach erwarteter Aktivität wurde 0.1 - 1 ml davon zu Z-Puffer gegeben (Endvolumen: 1 ml). Dazu wurden 1 Tropfen Chloroform und 2 Tropfen 0.1% SDS pipettiert, und es wurde für 10 sec gerührt (Vortex). Die Suspension wurde 5' bei 28°C belassen, mit 0.2 ml 4 mg/ml ONPG (in Z-Puffer) versetzt und bei 28°C inkubiert, bis eine deutliche gelbe Färbung sichtbar wurde. Die Reaktion wurde durch Zentrifugation der Bakterien gestoppt (s. oben), 0.6 ml davon wurden abgenommen und die OD bei 420 nm gemessen (Strahlengang: 1 cm). Die Aktivität wurde nach:

$$\text{Einheiten (U)} = \frac{\text{OD}_{420}}{\text{Reaktionszeit (in Minuten)} \times 0.00275}$$

berechnet. Eine Einheit ist definiert als die Menge Enzym, die bei 28°C, in einer Minute 1 pmol ONPG, bei Substratsättigung in 1 ml Ansatz umsetzt (entsprechend $OD_{420} = 0.0045$).

28.2 Nach Aufschluß der Zellen

Ein Aliquot der zu messenden Lösung (üblicherweise 2 - 10 µl) wurde zu 1 ml Z-Puffer gegeben (in einer Plastik-Küvette), und bei 28°C äquilibriert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.2 ml ONPG gestartet, die OD_{420} nach einer bestimmten Zeit abgelesen und die Aktivität wie in Methode 27.1 berechnet. Die Reaktion wurde *nicht* mit Na_2CO_3 (wie in (266) vorgeschrieben) gestoppt, weil gefunden wurde, daß die Zugabe dieses Salzes die OD in einer nicht-linearen Weise verändert.

29. Proteinbestimmung

Für die Mengenabschätzung des Proteingehaltes in bakteriellen Extrakten (vgl. Methode 25.1) wurden die Säulenfraktionen mit B-Puffer verdünnt und die optische Dichte bei 280 nm in einer Quarzküvette (Dicke = 1 cm) bestimmt. Eine Konzentration von 25 µg/ml kommerzieller β Galaktosidase ergibt eine OD_{280} von 0.07; daher ist die Proteinkonzentration (in µg/ml) nach

$$\text{Proteinkonzentration} = OD_{280} \times \frac{25}{0.07}$$

berechnet worden. Bei 280 nm wird praktisch nur der Tryptophan- und Tyrosingehalt von Peptiden erfaßt. Da die Messung der Proteinkonzentration mit β Galaktosidase (Trp + Tyr: ca. 7% (196)) geeicht wurde, sind die errechneten Werte für die Fusionspeptide ($\geq 4/5$ β Galaktosidase-Gehalt) relativ genau; da jedoch der mittlere Trp + Tyr Gehalt von E.coli-Peptiden ca. 3.9% beträgt, ist der tatsächliche Proteingehalt im Durchfluß der pAPTG-Säule (s. Resultate, 14.1) wahrscheinlich rund 2x größer als die errechneten Werte.

Die Proteinmenge in eukaryotischen Extrakten wurde nur von der Commassie-Färbung im Gel und Vergleich mit dem Marker abgeschätzt (s. Resultate, 20.).

IMMUNOLOGISCHE METHODEN

30. Immunisierung von Kaninchen mit bakteriellen Polypeptiden

Das Protokoll von (197) wurde im wesentlichen befolgt, jedoch ohne Benutzung von Aluminiumoxid. Es wurden jeweils 2 Kaninchen mit β Galaktosidase (Boehringer), Ammoniumsulfat-gefällten bzw. Guanidinium-denaturierten pFP2-Peptiden (vgl. Methode 25.1) immunisiert. Die Antigene wurden dazu auf folgende Weise vorbereitet: Die β Galaktosidase (geliefert als Lyophilisat) wurde in PBS aufgelöst; das Ammoniumsulfat-Pellet der pFP2-Peptide wurde resuspendiert, ein Aliquot wurde entnommen, zentrifugiert (Eppendorf), der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in PBS aufgelöst; das Dialysat der Guanidinium-denaturierten pFP2-Peptide wurde aufgetaut, ein Aliquot entnommen, mit PBS verdünnt und darin mittels Passagen durch eine Kanüle gut resuspendiert. Jeweils 0.25 mg β Galaktosidase-Äquivalente von jedem Antigen wurden insgesamt 4x in einem Abstand von 2 - 3 Wochen injiziert, außer bei der vierten pFP2-Injektion, bei der 0.5 mg eingesetzt wurden. Für die erste Injektion wurden die Antigene (in 0.5 ml PBS) mit 0.5 ml komplettem Freudschem Adjuvans (Sigma) gut emulgiert und an zwei Stellen des Rückens, subkutan, injiziert. Für die darauffolgenden Injektionen wurde inkomplettes Adjuvans (Sigma) genommen, mit Ausnahme der vierten pFP2-Injektion, wofür "RAS" (= "Ribi-Adjuvans-System") benutzt wurde (Antigene in 1 ml PBS). Diese Injektionen wurden intraperitoneal, an zwei verschiedenen Stellen des Bauchs appliziert. Vor der ersten Injektion wurden den Kaninchen jeweils ca. 10 ml Blut abgenommen (für das Präimmenserum). Vor der dritten und vierten Injektion wurden 5 - 10 ml, und nach der vierten 30 - 50 ml Blut von der Ohrvene abgezapft. Das Blut wurde jeweils 2 Stunden bei RT und über Nacht bei 4°C zur Gerinnung stehen gelassen. Es wurde 10', bei 4°C, mit 5000 rpm zentrifugiert, das Serum (ca. die Hälfte des Blutvolumens) wurde abgezogen, in Aliquoten von 0.5 - 1 ml geteilt und bei -20°C aufbewahrt. Die Entwicklung von spezifischen Antikörpern wurde durch Immundiffusion kontrolliert (s. Methode 30.). Wenn nicht anders vermerkt, wurde immer mit einer Mischung (zu gleichen Anteilen) der vier Anti-FP2 Antiseren gearbeitet.

31. Immundiffusion

Die Methode nach (272) wurde durchgeführt: Kleine Löcher, mit einem Durchmesser von 4 mm (genügend Raum für 20 μ l), wurden in ein 1%iges Agarosegel in 0.1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7.4, ausgestanzt. Für die Feststellung der Antiserumstär-

ke war die Anordnung der Löcher: Eines in der Mitte und weitere sechs kreisförmig im gleichen Abstand (4 mm) davon entfernt. In das mittlere Loch wurden 200 µg kommerzielle β Galaktosidase in B-Puffer + 50 mM β-Merkaptoäthanol und in die anderen steigende 1 : 1 Verdünnungen des jeweiligen Antiserums mit PBS pipettiert. Für den Nachweis von Anti-C550-Antikörpern (vgl. Resultate, 19., und Abb.37) wurden in das mittlere Loch das (unverdünnte) Anti-pFP2 Antiserum und in zwei radiale jeweils 50 µg β Galaktosidase bzw. 50 µg β Galaktosidase-Äquivalente der pFP2-Peptide (unmittelbar nach der Elution mit Na-Borat, vgl. Methode 25.1) gegeben; alle Volumina betrugen 20 µl. Die Diffusion war über Nacht, bei RT, im Dunkeln. Die Gele wurden dann (nach Bedarf) für 48 Stunden in PBS + 0.2% Natriumazid, bei RT, geschüttelt und die Präzipitationsbanden wie die Proteine in PAA-Gelen (s. Methode 1.7) gefärbt.

32. Präparation von Staphylokokken für die Immunpräzipitation

Die Staphylokokken wurden nach folgender Methode präpariert: 10 ml Medium (2.1% Müller-Hinton-Broth, 1% Trypton, 0.25% Hefeextrakt, 0.5% β-Glyzerinphosphat, 4 µg/ml Nicotinsäure, 2 µg/ml Thiamin) wurde mit Staphylokokken angeimpft und über Nacht bei 37°C, mit 160 rpm geschüttelt. Diese Vorkultur wurde zu 1 l gleichem Medium gegeben, die Bakterien wurden wie oben bis zur Sättigung geschüttelt und 5', bei 4°C, mit 7000 rpm zentrifugiert (Sorvall). Das Pellet wurde 2x mit 200 ml PBS + 0.05% Natriumazid gewaschen (Zentrifugation wie oben) und als 10%ige Suspension (Gewicht/Volumen, gewöhnlich 5 - 10 ml) in PBS + 1.5% Formaldehyd aufgenommen. Die Zellen wurden durch schnelles Rühren in dieser Lösung für 90', bei RT, fixiert. Sie wurden zentrifugiert (s. oben), mit gleichem Volumen PBS einmal gewaschen, in gleichem Volumen PBS aufgenommen und in einen Erlenmeyerkolben überführt, so daß die Schichthöhe der Suspension höchstens 1.5 cm betrug. Die Zellen wurden für 5', bei 80°C, mit 200 rpm geschwenkt und dann ebenfalls durch Schwenken in Eiswasser abgekühlt. Sie wurden anschließend noch 2x mit gleichem Volumen PBS gewaschen, bevor sie als 10%ige Suspension in PBS bei -80°C eingefroren wurden (Aufbewahrungsform für etliche Monate). Für die Präzipitation von Antigen/Antikörper-Komplexen (s. Methode 32.) durch das Protein A wurden die eingefrorenen Zellen zuerst auf folgende Weise behandelt: Sie wurden aufgetaut, homogen resuspendiert, in 1 ml-Portionen in Eppendorf-Gefäße gegeben und für 30 sec zentrifugiert. Das Pellet jeder Portion wurde jeweils in 1 ml Kochpuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 10% (1.426 M) β-Merkaptoäthanol, 3% SDS) resuspendiert und für 30' gekocht. Die letzte Prozedur wurde wiederholt, die Zellen wurden 4x mit jeweils 1 ml D-Puffer (0.15 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.02% SDS, 0.5% Aprotinin)

gewaschen, in 1 ml D-Puffer resuspendiert und für die Immunpräzipitation benutzt. Nicht sofort benutzte Zellen konnten für 1 - 2 Monate, bei -80°C aufbewahrt werden.

33. Immunpräzipitation

Wildtyp- β Galaktosidase und Fusionspeptide, die in vivo (Methode 27.2) mit ^{35}S -Methionin markiert worden waren, sind nach (248) mit den produzierten Antiseren (s.Methode 29.) präzipitiert worden. Die Bakterienpellets von der in vivo Markierung wurden in 200 μl Lyse-Puffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM EDTA, jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ DNase I, RNase A und Lysozym, 20 $\mu\text{g/ml}$ PMSF) resuspendiert, und, um die Zellen aufzubrechen, wurden sie dreimal jeweils 5', bei 37°C inkubiert und 5', bei -80°C eingefroren. Zu den Ansätzen wurden dann jeweils 20 μl 1 M MgCl_2 gegeben (Endkonzentration: 100 mM). Die Ansätze wurden 30', bei 37°C inkubiert, mit 55 μl 10% Triton X-100 versetzt (Endkonzentration: 2%), weitere 30', bei RT inkubiert, 15' bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf), und 200 μl vom Überstand wurden zu 100 μl 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5, 4 M NaCl gegeben (Ausgangskonzentrationen). Zu dieser Lösung wurden schließlich bis zu 100 μl Antiserum pipettiert (vgl.unten), und die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C belassen. Sie wurden dann mit 0.2 ml 10%iger Staphylokokken-Suspension (s.Methode 31) gemischt und 60' in Eis stehen gelassen. Die Staphylokokken wurden präzipitiert (30 sec, in der Eppendorf-Zentrifuge), der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde mit jeweils 1 ml folgender Lösungen gewaschen: 3x mit 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 M NaCl; 2x mit 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1% SDS, 0.5 M LiCl; und 1x mit Tris-Cl, pH 7.5. Das Bakterienpellet wurde dann in Auftrags-Puffer aufgenommen und wie in Methode 1.7 beschrieben durch PAA-Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

Gleiche Ergebnisse lieferten Experimente mit monoklonalen Antikörpern gegen β Galaktosidase (Promega, 5 μl der Lösung pro Ansatz). Das Endvolumen der Reaktion vor der über Nacht-Inkubation wurde hier mit H_2O ebenfalls auf 400 μl gebracht.

34. "Western-Blot"

Proteine wurden von PAA-Gelen auf Nitrozellulose-Membran nach der "Western-Blot"-Technik (271) transferiert. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese 1 Stunde, bei 4°C , im Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, pH 8.3, 30% Methanol) äquilibriert und ähnlich wie beim "Northern"-Transfer (S.Methode 23.4) mit folgenden Unterschieden präpariert: Nitrozellulose und Filterpapier (jeweils nur ein Blatt auf

jeder Seite des Gels) waren von Biorad, und alle Lagen vom sandwich waren mit obigem Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer fand über Nacht, mit einer Stromstärke von 0.3 A, unter Rühren des Puffers, bei 4°C statt. Die Membran wurde kurz in Wasser gespült und luftgetrocknet. Wenn erwünscht war, den Grad des Transfers zu kontrollieren, wurde einerseits das Gel mit Coomassie (s.Methode 1.7), und andererseits ein Teil der Nitrozellulose mit Amidoschwarz gefärbt; für Letzteres wurde die Membran in 0.1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure gefärbt und mit 90% Methanol, 2% Essigsäure entfärbt. Die Bindung der Antikörper an die transferierten Proteine wurde nach dem empfohlenen Protokoll von Biorad vorgenommen: Die freien, reaktiven Stellen auf der Membran wurden zuerst durch zweistündiges Schütteln in TBS + 3% Gelatine, bei RT, blockiert (TBS ist: 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.5 M NaCl). Die Antiseren wurden 1 : 50 bzw. 1 : 100 mit TBS + 1% Gelatine verdünnt, ca. 5 ml davon wurden mit der Membran in Plastiktaschen eingeschweißt und bei RT, 2 Stunden, rotiert. Die Membran wurde kurz in Wasser gespült und 2x 10', in ca. 200 ml TBS, bei RT, gewaschen. Peroxidase-konjugierte Ziegen-Anti-Kaninchen Immunglobuline (Biorad, Affinitäts-gereinigt) wurden dann als 1 : 1000-Verdünnung in TBS + 1% Gelatine zu der Membran gegeben und wie oben in Taschen eingeschweißt, inkubiert und gewaschen. 60 mg "HRP-Reagenz" (mit 4-Chlor-1-Naphthol) wurden in 20 ml kaltem Methanol (gehalten bei -20°C) gelöst und in den Kühlschrank (4°C) gestellt (Lösung "a"). Unmittelbar vor dem Bindungsnachweis wurden 60 µl 30%iges H₂O₂ (gehalten bei 4°C) zu 100 ml TBS (RT) gegeben (Lösung "b"). Lösungen a und b wurden bei RT gemischt, in eine Glaswanne gegeben, und die Membran wurde sofort hineingelegt. Die gesuchten Proteine (β Galaktosidase, pFP2-Peptide, bzw. C550-Huhn-Protein) wurden innerhalb von 15 sec - 2' sichtbar (violette Banden). Die Reaktion wurde durch Tauchen der Membran in 1 l Wasser gestoppt. Die Membranen wurden entweder luftgetrocknet, oder mit Wasser in Plastiktaschen eingeschweißt und im Dunkeln aufbewahrt.

Obwohl die in dieser Arbeit gezeigten Western-Ergebnisse mit der soeben beschriebene Methode erhalten wurden, wurde später der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose grundsätzlich in 10 mM Na-Borat, pH 9.3, (ohne Methanol) vorgenommen (198). Dadurch wird ein entscheidend effizienterer Transfer - vor allem im höhermolekularen Peptidbereich - erreicht.

MATHEMATISCHE BERECHNUNGEN

35. Anzahl der C550-RNA

Die quantitative Auswertung von S1 Nuklease-Experimenten wird in diesem Abschnitt exemplarisch für den Abbauschutz von C550 durch steigende RNA-Mengen (s. Resultate, 2., und Abb. 7) detailliert demonstriert. Gemessene und errechnete Werte beziehen sich auf die eingesetzten RNA-Mengen (1 - 5 - 10 - 20 - 50 - 100 μ g) und werden immer in dieser Reihenfolge geschrieben.

Molekülzahl der geschützten DNA-Stränge:

Als Indikator für etwaige Verluste der S1 Nuklease-Ansätze durch die Analyse während und nach der Elektrophorese waren 30000 cpm einer Marker-DNA (s. Abb. 7) auf das Gel aufgetragen und mitanalysiert worden. Nach der Elektrophorese, Trocknung und Exposition des Gels wurden die Gelstellen mit den radioaktiven Banden ausgeschnitten und (ohne das 3MM-Papier)

(1) direkt in Szintillationsflüssigkeit oder

(2) nach vollständiger Auflösung der Agarose in 8 M NaClO_4

gemessen. Beide Messungen ergaben ähnliche Werte, wovon, nach Abzug des Hintergrunds, der Mittelwert gebildet wurde (in cpm):

Marker-DNA (Summe der beiden Banden): 8573

Proben:

230	527	540	3605	5306	8262
-----	-----	-----	------	------	------

Ähnlich wurde die Radioaktivität auch bei der Bestimmung der Sättigungsmenge (s. Resultate, 2. und Abb. 6) und der Häufigkeit der C550-RNA in verschiedenen Geweben (s. Resultate, 3.) gemessen; für die Umrechnung der ^{32}P -Werte hier in Molekülzahlen wurden sie noch für den ^{32}P -Zerfall und die Verluste korrigiert:

Korrektur der Werte für den ^{32}P -Zerfall:

Marker-DNA: (für 4 Tage zwischen Gelauftrag und Messung) $\times 1.214 = 10408$

Proben: (für 11 Tage zwischen der pC550-Markierung und Messung) $\times 1.704 =$

392	898	920	6143	9041	14078
-----	-----	-----	------	------	-------

Korrektur der Probenwerte für die Verluste: (vgl. Marker, die wiedergefundene Menge entspricht ca. 35% der aufgetragenen, s. oben) $\times 2.86 =$

1120	2566	2629	17551	25831	40223
------	------	------	-------	-------	-------

Da eine 100%ige 5'-Markierung der DNA erzielt worden war, war die spezifische Aktivität der radioaktiven DNA-Enden gleich derjenigen von $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$, dh. ca. 3000 Ci/mmol, bzw.

$$1 \mu\text{Ci} = 2.2 \times 10^6 \text{ cpm} = 0.33 \text{ pmol Enden} = 1.99 \times 10^{11} \text{ Enden}$$

Die letzte Gleichung erlaubt eine Umrechnung der gefundenen Radioaktivität in die absolute Anzahl der geschützten C550-(Einzelstrang)Fragmente im jeweiligen Ansatz:

1.0×10^8	2.3×10^8	2.4×10^8	1.6×10^9	2.3×10^9	3.6×10^9
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Diese Werte entsprechen der Anzahl der C550-RNA-Moleküle, welche die C550-DNA vor Nukleolyse geschützt haben.

Molekülzahl der eingesetzten Total-RNA:

Die Nominal mengen Total-RNA, die für die Hybridisierung eingesetzt wurden, waren (in μg):

1	5	10	20	50	100
---	---	----	----	----	-----

Nach der DNA-Zugabe (jeweils $250 \times 10^3 \text{ cpm}$), Äthanol-fällung und Aufnahme in Hybridisierungspuffer wurde die Radioaktivität in den Proben noch einmal gemessen; es ergaben sich folgende Werte (in $\text{cpm} \times 10^3$):

165	182	182	200	212	202
-----	-----	-----	-----	-----	-----

prozentual (bezogen auf $250 \times 10^3 \text{ cpm}$):

66	73	73	80	85	81
----	----	----	----	----	----

Diese Werte wurden als Nucleinsäureverluste durch die Äthanol-fällung interpretiert. Die in den Proben noch vorhandenen realen RNA-Mengen waren also (in μg):

0.66	3.65	7.3	16	42.5	81
------	------	-----	----	------	----

Für die RNA-Spezies in Total-RNA wurde eine mittlere Länge von 2.9 kb angenommen; nach

$$1 \text{ Molekül } 2.9 \text{ kb RNA} = 1.624 \times 10^{-12} \mu\text{g} \cdot$$

$$1 \mu\text{g} = 6.16 \times 10^{11} \text{ Moleküle} = 1 \text{ pmol}$$

war in den Ansätzen folgende absolute Anzahl von RNA-Molekülen enthalten:

4.1×10^{11} 2.2×10^{12} 4.5×10^{12} 9.8×10^{12} 2.6×10^{13} 5.0×10^{13}

in pmol:

0.675 3.73 4.76 16.36 43.45 82.81

Prozentualer Anteil der C550-RNA in Total-RNA

Der Prozentsatz der C550-Moleküle in der Total-RNA Population kann errechnet werden, wenn sichergestellt ist, daß der Nukleaseschutz proportional zur eingesetzten RNA-Menge zunimmt, dh. wenn er eine *lineare* Funktion der RNA-Menge ist. Deshalb wurde die errechnete DNA-Molekülanzahl (s.oben) an eine *Regressions-Gerade* $y = mx + b$ angepaßt (s.in (186)), wobei y die Anzahl der geschützten C550-Moleküle, x die Total-RNA-Menge (in μg), m die Steigung der Geraden und b ihr Schnittpunkt mit der y -Achse ist. Die Bestimmung der Geradenparameter m und b erfolgte nach:

$$\text{Steigung } m = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{n} - \bar{x} \bar{y}}{\sigma_x^2}$$

und nach:

$$\text{Schnittpunkt } b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Danach sind:

$$m = 4.48 \times 10^7 \text{ (Moleküle}/\mu\text{g}) \text{ und } b = 1.85 \times 10^8 \text{ (Moleküle)}$$

(Aus plausiblen Gründen wurde der Punkt (0/0) mitberechnet). Die daraus resultierende Gerade ist in Abb.7B gezeigt. (Da als x -Werte für die Rechnung die *tatsächlichen* und nicht die nominalen RNA-Werte genommen wurden (s.oben), stimmen die angeschriebenen RNA-Mengen auf der Abszisse nicht mit den Schnittpunkten überein.) Der Korrelationskoeffizient k gibt an, wie gut die gefundenen Werte an die Gerade angepaßt werden konnten; es gilt:

$$k^2 = \frac{m^2 \sigma_x^2}{\sigma_y^2}$$

und hier ist $k = 0.97$.

Der hohe Korrelationskoeffizient (nahe 1) bedeutet eine gute Übereinstimmung mit der Geraden und erlaubt, die errechneten Werte für die C550-RNA (s.oben) als prozentualen RNA-Teil von Total-RNA anzugeben:

0.0250 0.0105 0.0055 0.0160 0.0090 0.0075

Der Durchschnitt dieser Werte ist 0.0123%, die Standardabweichung ist 0.0066%.

36. Anzahl der möglichen pFP1/M15-Komplexe

Folgende Überlegungen vermögen das Erscheinungsbild der pFP1/M15-Komplexe in der nicht-denaturierenden Elektrophorese (vgl. Abb. 31A) zu erklären: Ein aktiver Komplex besteht aus 4 M15 Molekülen und 4 Komplementationsdonoren. Wenn *mehr als eine* pFP1-Spezies die β Galaktosidase Funktion in vivo komplementieren kann, gibt es mehrere Möglichkeiten der Zusammensetzung der Donoren jedes einzelnen, aktiven Komplexes. Die Anzahl der möglichen Kombinationen C von distinkten Elementen eines "Multi-Sets" (199), die in unbegrenzter Anzahl zur Verfügung stehen, läßt sich nach

$$C = \binom{k - 1 + r}{r} = \frac{(k - 1 + r)!}{r! (k - 1)!} \quad (*)$$

berechnen, wobei k die Anzahl distinkter Elemente und r die Ordnung der Kombinationen (hier die zu besetzenden Plätze, also 4) sind. Bei k = 3 (pFP1-Polypeptide: b, d und f) ist nach (*)

$$C = \binom{3 - 1 + 4}{4} = \binom{6}{4} = \frac{6!}{4! 2!} = 15$$

Falls in vivo alle 4 pFP1-Polypeptide (a, b, d und f) synthetisiert werden (vgl. Resultate, 15.), ist k = 4 und somit nach (*)

$$C = \binom{4 - 1 + 4}{4} = \binom{7}{4} = \frac{7!}{4! 3!} = 35$$

Das bedeutet, daß es insgesamt bis zu 35 aktive Komplexe gibt, die sich in der Zusammensetzung ihrer Komplementations-Donoren unterscheiden. Da diese verschiedenen Molekülspezies in ihrer Ladung offensichtlich nicht allzu divergent sind, erscheinen sie, auf Grund ihres leicht unterschiedlichen Molekulargewichtes, im nativen Gel als dicht aufeinanderfolgende Proteinbanden.

37. Häufigkeit der *in vivo* pFP2-t→pFP2 Rekombination

Die spontane Rekombinationsrate α (299) von pFP2-t zu pFP2 pro Zelle und Generation kann berechnet werden nach

$$\alpha = \frac{m \times \ln 2}{N}$$

wobei m die mittlere Rekombinationsfrequenz (Σ der Sektoren/ Σ der Kolonien) und N die Zellzahl pro Kolonie ist (ca. 4×10^8). Unter 46 hellblauen Kolonien auf einer Platte mit insgesamt 36 dunkelblauen Sektoren ($\frac{m}{N} = 0.783$) beträgt sie also nach der oberen Formel 1.36×10^{-8} .

L I T E R A T U R

Abkürzungen:

PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA
 NAR: Nucleic Acids Research
 JBC: The Journal of Biological Chemistry
 CSHSQB: Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology
 TIBS: Trends in Biochemical Sciences
 BBA: Biochimica et Biophysica Acta

- (1) M Duchene, ME Sobel and PK Müller (1982); Exp.Cell Res. 142:317-324
- (2) E Pöschl (1984); Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- (3) RV Krstic (1982); in: Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere, Springer: 99-235
- (4) P Bornstein and H Sage (1980); Ann.Rev.Biochem. 49:957-1003
- (5) a) EJ Miller and S Gay: 3-32
 b) JA Foster: 559-570
 in: Methods Enzymol. 82 (1982), Academic Press
- (6) GR Martin, R Timpl, PK Müller and K Kühn (1985); TIBS 10:285-287
- (7) a) K Kühn: 29-69
 b) AG Nerlich, E Pöschl, T Voss and PK Müller: 70-90
 c) K von der Mark: 272-315
 d) AR Poole: 316-371
 in: Rheumatology 10 (1986), Karger Verlag
- (8) K Kühn (1986); in: Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion (ed: H Tschesche), Walter de Gruyter : 107-143
- (9) a) KA Pietz: 1-39
 b) S Hakomori, M Fukuda, K Sekiguchi and WG Carter: 229-275
 c) JM Gosline and J Rosenbloom: 191-227
 d) D Heinegard and M Paulsson: 277-328
 e) A Veis: 329-374
 f) AH Reddi: 375-412
 in: Extracellular Matrix Biochemistry (eds: KA Pietz and AH Reddi) (1984), Elsevier
- (10) DJ Prockop, KI Kivirikko, L Tuderman and NA Guzman (1979); NE Journal Med. 301:13-23

- (11) E Ruoslahti, E Engval and EG Hayman (1981); Coll.Res. 1:95-128
- (12) KM Yamada (1983); Ann.Rev.Biochem. 52:761-799
- (13) KM Yamada, SK Akiyama, T Hasegawa, E Hasegawa, MJ Humphries, DW Kennedy, K Nagata, H Urushihara, K Olden and Wt Chen (1985); J.Cell.Bioch. 28:79-97
- (14) R Timpl, J Engel and GR Martin (1983); TIBS 8:207-209
- (15) AT Hewitt, HH Varner, MH Silver, W Dessau, CM Wilkes and GR Martin (1982); JBC 257:2330-2334
- (16) LB Sandberg, NT Soskel and JG Leslie (1981); NE Journal Med. 304:566-579
- (17) AR Poole (1986); Biochem.J. 236:1-14
- (18) a) K Kühn and R Timpl: 49-51
b) S Ricard-Blum and D Herbage: 53-64
in: Biology of Invertebrate and Lower Vertebrate Collagens (eds: A Bairatti and R Garrone) (1985), Plenum Press
- (19) K Kühn and K von der Mark (1978); in: Collagen Platelet Interaction (ed: H Gastpar), Schattauer Verlag: 123-126
- (20) TR Oegema, J Laidlow, VC Hascall and DD Dziewiatkowski (1975); Arch.Biochem.Biophys. 170:698-709
- (21) BP Toole (1976); JBC 251:895-897
- (22) U Lindahl and M Höök (1978); Ann.Rev.Biochem. 47:385-417
- (23) JE Scott, CR Orford and EW Hughes (1981); Biochem.J. 195:573-581
- (24) JE Scott and CR Orford (1981); Biochem.J. 197:213-216
- (25) GN Smith Jr., JM Williams and KD Brandt (1985); JBC 260:10761-10767
- (26) PH Stern (1980); Pharmacological Reviews 32:47-80
- (27) ED Hay (1983); in: Modern Cell Biology (ed: JR McIndosh), Alan R Liss, 2:509-548
- (28) K von der Mark, J Mollenhauer, U Kühn, J Bee and H Lesot (1984); in: The role of extracellular matrix in development, Alan R Liss :67-87
- (29) K von der Mark and U Kühn (1985); BBA 823:147-160
- (30) DWL Hukins and RM Aspden (1985); TIBS 10:260-264

- (31) RJ Minns and FS Steven (1977); Br.J.Exp.Pathol. 58:572-579
- (32) G Kempson (1980); in: The joints and synovial fluid (ed: Sokoloff), Academic press, 2:177-238
- (33) WD Komper and TC Laurent (1978); Physiol.Rev. 58:255-315
- (34) RA Kosher and RL Church (1975); Nature 258:327-330
- (35) JW Lash and NS Vasan (1978); Devel.Biol. 66:151-171
- (36) RA Kosher, JW Lash and RR Minor (1973); Devel.Biol. 35:210-220
- (37) N Sorgente, KE Kuttner, LW Soble and R Eisenstein (1975); Lab.Invest. 32:217-222
- (38) H Nogami and MR Urist (1974); J.Cell.Biol. 62:510-519
- (39) GT Syftestad, JT Triffitt, MR Urist and AI Caplan (1984); Calcif.Tissue Int. 36:625-627
- (40) P Osdoby and AI Caplan (1979); Devel.Biol. 73:84-109
- (41) SM Seyedin, TC Thomas, AY Thompson, DM Rosen and KA Pietz (1985); PNAS 82:2267-2271
- (42) H Seppa, S Seppa, GR Grotendorst, V Gauss-Müller, HK Kleinmann, E Schiffman and GR Martin (1982); in: Connective tissue of the normal and fibrotic human liver (eds: O Germach, G Pott, J Rautherberg and B Yoss), Shattover-Verlag
- (43) PK Müller, E Kirsch, V Gauss-Müller and T Krieg (1981); Mol.Cell.Biochem. 34:73-85
- (44) a) PK Mueller, AG Nerlich, J Böhm, L Phan-Than and T Krieg: 99-118
b) RA Berg: 29-52
in: Regulation of Matrix Accumulation (ed: RP Mecham) (1986), Academic Press
- (45) S Krane (1982); Conn. Tissue Res. 10:51-59
- (46) SR Pinell and S Murad (1983); in: The metabolic basis of inherited disease (eds: RS Laufer, E Warren and D McIvor), McGraw-Hill :1425-1449
- (47) L Haemaelainen, J Oikarinen and KJ Kivirikko (1985); JBC 260:720-715
- (48) RJ Rokowski, J Sheely and KR Cutroneo (1981); Arch.Biochem.Biophys. 210:74-81

- (49) KM Steling, Jr, MJ Harris, JJ Mitchell, TA di Petrillo, GL Delaunay and KR Cutroneo (1983); JBC 258:7644-7647
- (50) BE Kream, DW Rowe, SC Gworek and LG Raisz (1980); PNAS 77:5654-5658
- (51) RS Bienkowski, MJ Cowan, JA McDonald and RG Crystal (1978); JBC 253:4356-4363
- (52) J Rosenbloom, G Feldman, B Freundlich and SA Jimenez (1984); Biochem.Biophys.Res.Comm. 123:365-372
- (53) ML Sephenson, SM Krane, EP Amento, PA McCroskery and M Byrne (1985); FEBS L. 180:43-49
- (54) CJ Handley, PR Brooks, DA Lowther (1978); BBA 544:441-444
- (55) M Aalto, M Potila and EL Kulonen (1979); BBA 587:606-617
- (56) BL Lyons and RJ Schwarz (1984); NAR 12:2569-2579
- (57) H Oikarinen, AI Oikarinen, EML Tan, RP Abergel, CA Meeker, ML Chu, DJ Prokop and J Uitto (1985); J.Clin.Invest. 75:1545-1553
- (58) S Murad, D Grove, KA Lindberg, G Reynolds, A Sivarajah and SR Pinell (1981); PNAS 78:2879-2882
- (59) DJ Prockop, RA Berg, KI Kivirikko and J Uitto (1976); in: Biochemistry of Collagen (eds: GN Ramachandran and AH Reddi), Plenum Press: 163-273
- (60) RC Siegel (1979); Int.Rev.Conn.Tissue Res. 8:73-118
- (61) P Tolstoshev, RA Berg, SI Rennard, KH Bradley, BC Trapnell and RG Crystal (1981); JBC 256:3135-3140
- (62) P Tolstoshev, R Haber, BC Trapnell and RG Crystal (1981); JBC 256:9672-9679
- (63) RC Moen, DW Rowe and RD Palmiter (1979); JBC 254:3526-3530
- (64) S Abe, BU Steinmann, LM Wahl and GR Martin (1979); Nature 279:442-444
- (65) DJ Prockop, KI Kivirikko, L Tuderman and NA Guzman (1979); NE Journal Med. 301:77-85
- (66) LC Gerstenfeld, MH Finer and H Boedker (1985); Mol.Cell.Biol. 5:1425-1433
- (67) DJ Prockop and KI Kivirikko (1984); NE Journal Med. 311:376-386

- (68) a) ML Moss and L Moss-Salentijn: 1:1-30
 b) R Mayne and K von der Mark: 1:181-214
 c) RA Stockwell: 1:253-280
 d) DA Ede: 2:143-185
 e) JR Hinchliffe and DR Johnson: 2:255-295
 f) SY Ali: 1:343-378
 g) SI Hunter and AI Caplan: 2:87-119
 h) M Silbermann: 2:327-368
 i) WA Elmer: 2:369-399
 j) M Solursh: 2:121-141
 in: Cartilage (ed: BK Hall) (1983), Academic Press
- (69) M Okayama, M Pacifici and H Holzer (1976); PNAS 73:3224-3228
- (70) D Heinegard, M Paulsson, S Inerot and S Carlstrom (1981); Bioch.J. 197:355-366
- (71) T Shinomura, K Kimata, Y Oike, A Noro, H Hirose, K Tanabe and S Suzuki (1983); JBC 258:9314-9322
- (72) VC Hascall (1981); in: Biology of Carbohydrates (ed: V Ginsburg), Wiley: 1-49
- (73) EJ Miller (1971); Biochemistry 10:1652-1659
- (74) RS Fife, B Caterson and SL Myers (1985); J.Cell.Biol. 100:1050-1055
- (75) H Choi, LH Tang, TL Johnson, S Pal, L Rosenberg and AR Poole (1983); JBC 258:655-661
- (76) M Paulsson and D Heinegard (1981); Biochem.J. 197: 367-375
- (77) AR Poole, I Pidoux, A Reiner, H Choi and LC Rosenberg (1984); J.Cell.Biol. 98:54-65
- (78) ME Lowe, M Pacifici and H Holtzer (1978); Cancer Res. 38:2350-2356
- (79) PAD Parry, GRG Bernes and AS Craig (1978); Proc.R.Soc. London (Biology) 203:305-321
- (80) MD Grynepas, DR Eyrl and DA Kirschner (1980); BBA 626:346-355
- (81) AH Reddi (1981); Coll.Res. 1:209-226
- (82) BK Hall (1978); Developmental and Cellular Skeletal Biology, Academic Press
- (83) AW Ham and DW Cormack (1979); in: Histology, JB Lippincott: 377-462
- (84) CT Singley and M Solursh (1981); Devel.Biol. 84:102-120

- (85) W Dessau, H von der Mark, K von der Mark and S Fischer (1980); *J.Embryol.Exp.Morphol.* 57:51-60
- (86) BP Toole (1972); *Devel.Biol.* 29:321-329
- (87) T Shinomura, K Kimata, Y Oike, N Maeden, S Yano and S Suzuki (1984); *Devel.Biol* 103:211-220
- (88) H von der Mark, K von der Mark and S Gay (1976); *Devel. Biol.* 48:237-249
- (89) O Capasso, N Quatro, F Descalzi-Cancedda and R Cancedda (1984); *EMBO J.* 3:823-827
- (90) O Capasso, G Tajana and R Cancedda (1984); *Mol.Cell. Biol.* 4:1163-1168
- (91) TM Schmid and TF Linsenmayer (1985); *J.Cell.Biol.* 100:598-605
- (92) K von der Mark (1978); in: 11th FEBS Meeting (Growth Factors), Pergamon Press: 35-44
- (93) R Umansky (1966); *Devel.Biol.* 13:31-56
- (94) PD Benya, SR Padilla and ME Nimni (1977); *Biochemistry* 16:865-872
- (95) PD Benya, SR Padilla and ME Nimni (1978); *Cell* 15:1313-1321
- (96) R Mayne, MS Vail, PM Mayne and EJ Miller (1976); *PNAS* 73:1674-1678
- (97) JR Schiltz, R Mayne and H Holzer (1973); *Differentiation* 1:97-108
- (98) BM Vertel and A Dorfman (1979); *PNAS* 76:1261-1264
- (99) PK Müller, L Lemmen, S Gay, V Gauss and K Kühn (1977); *Exp.Cell Res.* 108:47-55
- (100) W Dessau, J Sasse, R Timpl, F Jilek and K von der Mark (1978); *J.Cell.Biol.* 79:342-355
- (101) K von der Mark, V Gauss, H von der Mark and PK Müller (1977); *Nature* 267: 531-532
- (102) W Dessau, BM Vertel, H von der Mark and K von der Mark (1981); *J.Cell.Biol.* 90:78-83
- (103) O Capasso, E Gionti, G Pontarelli, FS Ambesi-Impiombato, L Nitsch, G Tajana and R Cancedda (1982); *Exp.Cell Res.* 142:197-206
- (104) AL Horwitz and A Dorfman (1970); *J.Cell.Biol.*

45:434-438

- (105) S Yasumoto, Y Kato, K Oguri, S Yamagata and T Yamagata (1980); Development, Growth and Differentiation 22:445-459
- (106) PC Amadio, MG Ehrlich and HJ Mankin (1983); Conn.Tissue Res. 11:11-19
- (107) R Mayne, MS Vail and EJ Miller (1975); PNAS 72:4511-4515
- (108) V Gauss and PK Müller (1981); BBA 652:39-47
- (109) R Mayne, MS Vail and EJ Miller (1976); Devel.Biol. 54:230-240
- (110) CM West, R Lanza, J Rosenbloom, M Lowe and H Holtzer (1979); Cell 17:491-501
- (111) K Deshmukh and EG Kline (1976); Eur.J.Biochem. 69:117-123
- (112) K Deshmukh and B Sawyer (1977); PNAS 74:3864-3868
- (113) R Hein, T Krieg, PK Müller and O Braun-Falko (1984); Bioch.Pharm. 33:3263-3267
- (114) B Peterkofky (1972); Arch.Biochem.Biophys. 152:318-328
- (115) JC Daniel, BU Pauli and KF Kuttner (1984); J.Cell.Biol. 99:1960-1969
- (116) R Mayne, BW Elrod, PM Mayne, RD Sanderson and TF Linselmayer (1984); Exp.Cell Res. 151:171-182
- (117) MH Finer, LC Gerstenfeld, D Young, P Doty and H Boedker (1985); Mol.Cell.Biol. 5:1414-1424
- (118) M Pacifici, D Boettiger, K Roby and H Holtzer (1977); Cell 11:891-899
- (119) M Yoshimura, SA Jimenez and A Kaji (1981); JBC 256:9111-9117
- (120) SL Adams, D Boettiger, RJ Focht, H Holtzer and M Pacifici (1982); Cell 30:373-384
- (121) E Gionti, O Carpasso and R Cancedda (1983); JBC 258:7190-7194
- (122) S Alema, F Tato and D Boetiger (1985); Mol.Cell.Biol. 5:538-544
- (123) M Muto, M Yoshimura, M Okayama and A Kaji (1977); PNAS 74:4173-4177

- (124) M Pacifici, SA Fellini and H Holtzer (1981); JBC 256:1029-1037
- (125) PC Marchisio, O Capasso, L Nitsch, R Cancedda and E Gionti (1984); Exp.Cell Res. 151:332-343
- (126) NC Zanetti and M Solursh (1984); J.Cell.Biol. 99:115-123
- (127) a) H Boedtker, M Finer and S Aho: 85-116
 b) F Ramirez, M Bernhard, C Mon-Li, L Dickson, F Sangiorgi, D Weil, W de Wet, C Junien and M Sobel: 117-129
 c) WB Upholt, CM Strom and LJ Sandell: 130-140
 d) BR Olsen, Y Ninomiya, G Lozano, H Konomi, M Gordon, G Green, J Parsons, J Seyer, H Thomson and G Vasios: 141-153
 e) B de Crombrughe, A Schmidt, G Lian, C Setoyama, M Mudryj, Y Yamada and C McKeon: 154-162
 f) D Hirsch, GN Cox, JM Kramer, D Stinchcomb and R Jefferson: 163-171
 g) SL Adams, M Pacifici, RJ Focht, ES Allebach and D Boettiger: 202-213
 in: Biology, Chemistry and Pathology of collagen (eds: RF Fleischmeyer, BR Olsen and K Kühn) (1985), Annals of the NY Academy of Sciences, vol. 460
- (128) II Singer (1979); Cell 16:675-685
- (129) PD Benya and JD Schaffer (1982); Cell 30:215-224
- (130) M Adam and Z Deyl (1983); Clin.Chim.Acta 133:25-32
- (131) BJ Swalla and M Solursh (1984); Differentiation 26:42-48
- (132) JR Hassel, JR Pennypacker and CA Lewis (1978); Exp.Cell Res. 112:409-417
- (133) CA Lewis, RM Pratt, JP Pennypacker and JR Hassel (1978); Devel.Biol. 64:31-47
- (134) D Levitt and A Dorfman (1972); PNAS 69:1253-1257
- (135) D Levitt and A Dorfman (1973); PNAS 70:2201-2205
- (136) H Boedtker, F Fuller and V Tate (1983); in: Int.Rev.Conn.Tissue Res. 10:1-63
- (137) Y Ninomiya, M Gordon, M van der Rest, T Schmid, T Linsenmayer and BR Olsen (1986); JBC 261:5041-5050
- (138) H Hirano, Y Yamada, M Sullivan, B de Crombrughe, I Pastan and KM Yamada (1983); PNAS 80:46-50
- (139) LJ Sandell, Y Yamada, A Dorfman and W Upholt (1983);

JBC 258:11617-11621

- (140)WB Upholt and LJ Sandell (1986); PNAS 83:2325-2329
- (141)Y Yamada, VE Avvedimento, M Mundryj, H Ohkubo, G Vogeli, M Irani, I Pastan and B de Crombrughe (1980); Cell 22:887-892
- (142)E Solomon and KSE Cheah (1981); Nature 291:450-451
- (143)H Boedtker and S Aho (1984); Biochem.Soc.Symp. 49:67-84
- (144)M Kurkinen, MP Bernard, DP Barlow and LT Chow (1985); Nature 317:177-179
- (145)G Lozano, Y Ninomiya, H Thompson and BR Olsen (1985); PNAS 82:4050-4054
- (146)JM Monson, J Nalzle, J Friedeman and BJ McCarthy (1982); PNAS 79:1761-1765
- (147)JM Kramer, GN Cox and D Hirsch (1982); Cell 30:599-606
- (148)G Vogeli, H Ohkubo, ME Sobel, Y Yamada, I Pastan and B de Crombrughe (1981); PNAS 78:5334-5338
- (149)K Kohno, M Sullivan and Y Yamada (1985); JBC 260:4441-4447
- (150)PJ Pawlowski, GT Brierly and LN Lukens (1981); JBC 256:7695-7698
- (151)S Saye, LN Lukens and PJ Pawlowski (1985); JBC 260:3812-3819
- (152)E Allebach, D Boettiger, M Pacifici and SL Adams (1985); Mol.Cell.Biol. 5:1002-1008
- (153)S Sandmeyer, B Gallis and P Bornstein (1981); JBC 256:5022-5028
- (154)W Doerfler (1983); Ann.Rev.Biochem. 52:93-124
- (155)MP Fernandez, MF Young and ME Sobel (1985); JBC 260:2374-2378
- (156)C McKeon, H Ohkubo, I Pastan and B de Crombrughe (1982); Cell 29:203-210
- (157)R Stein, N Sciaky-Gallini, A Razin and H Cedar (1983); PNAS 80:2422-2426
- (158)RJ Focht and SL Adams (1984); Mol.Cell.Biol. 4:1843-1852
- (159)LM Paglia, M Wiestner, M Duchene, LA Quellette, D

- Hörlein, GR Martin and PK Müller (1981); Biochemistry 20:3523-3527
- (160) Y Yamada, M Mudryj and B de Crombrughe (1983); JBC 258:14914-14919
- (161) ME Sobel, T Yamamoto, SL Adams, RD Lauro, VE Avvedimento, B de Crombrughe and I Pastan (1978); PNAS 75:5846-5850
- (162) F Bolivar, RL Rodriguez, PJ Greene, MC Betlach, HL Heyneker and HW Boyer (1977); Gene 2:95-113
- (163) F Fuller and H Boedtke (1981); Biochemistry 20:996-1006
- (164) AJ Berk and PA Sharp (1977); Cell 12:721-732
- (165) H Lehrach, AM Frischauf, D Hanahan, J Wozney, F Fuller and H Boedtke (1979); Biochemistry 18:3146-3152
- (166) N Battula and LA Loeb (1976); JBC 251:982-986
- (167) TE Shenk, C Rhodes, PWJ Rigby and P Berg (1975); PNAS 72:989-993
- (168) H Land, M Grez, H Hauser, W Lindenmaier and G Schutz (1981); NAR 9:2251-2266
- (169) CA Weaver, DF Gordon and B Kemper (1981); PNAS 78:4073-4077
- (170) T Kornberg and A Kornberg (1974); in: The Enzymes (ed: PD Boyer), 3rd edition, Academic Press, 10:119-144
- (171) J Falavoro, R Treisman and R Kamen (1980); Methods Enzymol. 65:718-749
- (172) U Gubler and BJ Hoffman (1983); Gene 25:263-269
- (173) D Cravis and WB Upholt (1985); Devel.Biol. 108:164-172
- (174) R Heumann, S Korsching, J Scott and H Thoenen (1984); EMBO J. 3:3183-3189
- (175) H Okayama and P Berg (1982); Mol.Cell.Biol. 2:161-170
- (176) GJ Gibson and MH Flint (1985); J.Cell.Biol. 101:277-284
- (177) MW McDonell, MN Simon and FW Studier (1977); J.Mol.Biol. 110:119-146
- (178) JM Bailey and N Davidson (1976); Anal.Biochem. 70:75-85
- (179) T Maniatis, EF Fritsch and J Sambrook (1982); Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory

- (180)W Arber and D Dussoix (1962); J.Mol.Biol. 5:18-36
- (181)MV Norgard, K Emigholz and JJ Monahan (1979); J.Bacteriol. 138:270-272
- (182)DB Clewell (1972); J.Bacteriol. 110:667-676
- (183)GSAB Steward, S Lubinsky-Mink, CG Jackson, A Cassel and J Kuhn (1986); Plasmid 15:172-181
- (184)RW Davis, M Thomas, J Cameron, TPS John, S Scherer and RA Padgett (1980); Methods Enzymol. 65:404-411
- (185)RC Strohmman, PS Moss, J Micou-Eastwood and D Spector (1977); Cell 10:265-273
- (186)E Kreyszig; Statistische Methoden und ihre Anwendungen, Vandenhoeck und Ruprecht: 258-323
- (187)I Grummt, C Soellner and I Scholz (1979); NAR 6:1351-1369
- (188)FR Blattner, BG Williams, AE Blechl, K Denniston-Thomson, HE Faber, LA Furlong, DJ Grunwald, DO Kiefer, DD Moore, JW Schumm, EL Sheldon and O Smithies (1977); Science 196:161-169
- (189)BG Williams and FR Blattner (1980); in: Genetic Engineering, Principles and Methods (eds: JK Setlow and A Hollaender), Plenum Press, 2:201-281
- (190)BG Williams and FR Blattner (1979); J.Virol. 29:555-575
- (191 - 194: gestrichen bei der Durchsicht)
- (195)EY Chen and PH Seeburg (1985); DNA 4:165-170
- (196)GR Craven, E Steers, Jr, and CB Anfinsen (1965); JBC 240:2468-2477
- (197)N Green, H Alexander, A Olson, S Alexander, TM Shinnick, JG Sutcliffe and RA Lerner (1982); Cell 28:477-487
- (198)J Renart and IV Sandoval (1984); Methods Enzymol. 104:455-460
- (199)RA Brualdi (1977); Introductory Combinatorics, North-Holland
- (200)L Clarke and J Carbon (1976); Cell 9:91-99
- (201)AR Wyman, LB Wolfe and D Botstein (1985); PNAS 82:2880-2884

- (202)WF Nader (1986); in: The molecular biology of *Physarum polycephalum* (eds: WF Dove, J Dee, S Hatano, FB Hangli and KE Wohlfahrt-Bottermann), Plenum Publishing Corporation: 291-300
- (203)F Sanger, AR Coulson, GF Hong, DF Hill and GB Petersen (1982); J.Mol.Biol. 162:729-773
- (204)J Vieira and J Messing (1982); Gene 19:259-268
- (205)LHT van der Ploeg, D Valerio, T De Lange, A Bernards, P Borst and FG Grosveld (1982); NAR 10:5905-5923
- (206)JW Szostak and EH Blackburn (1982); Cell 29:245-255
- (207)EH Blackburn and PB Challoner (1984); Cell 36:447-457
- (208)T De Lange and P Borst (1982); Nature 299:451-453
- (209)HB Gray, Jr, DA Ostrander, JL Hodnett, RJ Legerski and DL Robbertson (1975); NAR 2:1459-1492
- (210)DJ Watson (1972); Nature New Biol. 239:197-201
- (211)A Bernards, PAM Michels, CR Lincke and P Borst (1983); Nature 303:592-597
- (212)T Cavalier-Smith (1983); Nature 301:112-113
- (213)RM Walmsley, JW Szostak and TD Petes (1983); Nature 302:84-86
- (214)E Pays, M Guyaux, D Aerts, N van Meirvenne and M Steinert (1985); Nature 316:562-564
- (215)JC Alwine, DJ Kemp and GR Stark (1977); PNAS 74:5350-5354
- (216)H Domdey, K Wiebauer, M Kazmaier, V Müller, K Odink and G Fey (1982); PNAS 79:7619-7623
- (217)JE Darnell, Jr, (1982); Nature 297:365-371
- (218)JG Belasko, G Nilsson, A von Gabain and SN Cohen (1986); Cell 46:245-251
- (219)E Serfling, M Jasin and W Schafner (1985); Trends Genet. 1:224-230
- (220)WS Dynan and R Tjian (1985); Nature 316:774-778
- (221)B Lewin (1974); Gene Expression (vol.1: Bacterial Genomes), John Wiley and Sons
- (222)SE Leff, MG Rosenfeld and RM Evans (1986); Ann.Rev.Biochem. 55:1091-1117

- (223)O Hagenbüchle, M Tosi, U Schibler, R Bovery, PK Wellauer and RA Young (1981); Nature 289:643-646
- (224)C Benyajati, N Spoerel, H Haymerle and M Ashburner (1983); Cell 33:125-133
- (225)Y Nabeshima, Y Fujii-Kuriyama, M Muramatsu and K Ogata (1984); Nature 308:333-338
- (226)P Early, J Rogers, M Davis, K Calame, M Bond, R Wall and L Hood (1980) Cell 20:313-319
- (227)MG Rosenfeld, JJ Mermod, SG Amara, LW Swanson, PE Sawchenko, J Rivier, WW Vale and RM Evans (1983); Nature 304:129-135
- (228)CR King and J Piatigorsky (1983); Cell 32:707-712
- (229)AR Kornblihtt, K Umezawa, K Vibe-Pedersen and FE Baralle (1985); EMBO J. 4:1755-1759
- (230)AR Fersht and JW Knill-Jones (1981); PNAS 78:4251-4255
- (231)NJ Proudfoot, A Gil and T Maniatis (1982); Cell 31:553-563
- (232)CD Wilde (1985); Critical Rev.Biochem. 19:323-352
- (233)AM Maxam and W Gilbert (1980); Methods Enzymol. 65:499-560
- (234)N Blin and DW Stafford (1976); NAR 3:2303-2308
- (235)RH Tullis and H Rubin (1980); Analyt.Biochem. 107:260-264
- (236)T Maniatis, RC Hardison, E Lacy, J Lauer, C O'Connell, D Quon, GK Sim and A Efstratiadis (1978); Cell 15:687-701
- (237)B Hohn (1979); Methods Enzymol. 68:299-309
- (238)A Dugaiczky, HW Boyer and HM Goodman (1975); J.Mol.Biol. 96:171-184
- (239)M Dagert and SD Ehrlich (1979); Gene 6:23-28
- (240)T Maniatis, SG Kee, A Efstratiadis and FC Kafatos (1976); Cell 8:163-182
- (241)EM Southern (1975); J.Mol.Biol. 98:503-517
- (242)SGS Tsao, CF Brunk and RE Pearlman (1983); Analyt.Biochem. 131:365-372
- (243)M Grunstein and DS Hogness (1975); PNAS 72:3961-3965

- (244)PS Thomas (1980); PNAS 77:5201-5205
- (245)PS Thomas (1983); Methods Enzymol. 100:255-266
- (246)PA Overbeek, GT Merlino, NK Peters, VH Cohn, GP Moore and LJ Kleinsmith (1981); BBA 656:195-205
- (247)GM Wahl, M Stern and GR Stark (1979); PNAS 76:3683-3687
- (248)HA Shuman, TJ Silhavy and JR Beckwith (1983); JBC 255:168-174
- (249)DV Goeddel, DG Kleid, F Bolivar, HL Heyneker, DG Yansura, R Crea, T Hirose, A Kraszewski, K Itakura and AD Riggs (1979); PNAS 76:106-110
- (250)K Itakura, T Hirose, R Crea, AD Riggs, HL Heyneker, F Bolivar and H Boyer (1977); Science 198:1056-1063
- (251)AV Fowler and I Zabin (1983); JBC 258:14354-14358
- (252)U Rüther and B Müller-Hill (1983); EMBO J. 10:1791-1794
- (253)MJ Casadaban, J Chou and SN Cohen (1980); J.Bacteriol. 143:971-980
- (254)J Germino, JG Gray, H Charbonneau, T Vanaman and D Bastia (1983); PNAS 80:6848-6852
- (255)MJ Casabadan, A Martinez-Arias, SK Shapira and J Chou (1983); Methods Enzymol. 100:293-308
- (256)NP Minton (1984); Gene 31:269-273
- (257)M Koenen, U Rüther and B Müller-Hill (1982); EMBO J. 4:509-512
- (258)Y Masui, J Coleman and M Inouye (1983); in: Experimental Manipulation of Gene Expression (ed: M Inouye), Academic Press: 15-32
- (259)C Yanisch-Perron, J Vieira and J Messing (1985); Gene 33:103-119
- (260)U Rüther, M Koenen, K Otto and B Müller-Hill (1981); NAR 9:4087-4098
- (261)U Rüther (1982); NAR 10:5765-5772
- (262)HE Varmus, RL Perlman and I Pastan (1970); JBC 245:6366-6372
- (263)JC Wang (1979); PNAS 76:200-203
- (264)UK Laemmli (1970); Nature 227:680-685

- (265)J Shine and L Dalgarno (1975); *Nature* 254:34-38
- (266)JH Miller (1972); *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- (267)J Collins (1979); *Gene* 6:29-42
- (268)E Steers, Jr, P Cuatrecasas and HB Pollard (1971); *JBC* 246:196-200
- (269)AV Fowler and I Zabin (1977); *PNAS* 74:1507-1510
- (270)SK Shapira, J Chou, EV Richaud and MJ Casadaban (1983); *Gene* 25:71-82
- (271)H Towbin, T Staehelin and J Gordon (1979); *PNAS* 76:4350-4354
- (272)O Ouchterlony (1966); *Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis*, Ann Arbor Science Publishers
- (273)Synthetic peptides as antigenes. Ciba Foundation Symposium 119 (1986), John Wiley and Sons
- (274)MJ Carrier, ME Nugent, WCA Tacon and SB Primrose (1983); *Trends in Biotechnology* 1:109-113
- (275: gestrichen bei der Durchsicht)
- (276)J Germino and D Bastia (1983); *Cell* 32:131-140
- (277)RC Dickson, J Abelson, WM Barnes and WS Reznikoff (1975); *Science* 187:27-35
- (278)L Guarente, G Lauer, TM Roberts and M Ptashne (1980); *Cell* 20:543-555
- (279)M Ptashne, K Backman, MZ Humayun, A Jeffrey, R Maurer, B Meyer and RT Sauer (1976); *Science* 194:156-161
- (280)M Kozak (1984); *NAR* 12:857-872
- (281)CC Baker, J Herisse, G Courtois, F Galibert and E Ziff (1979); *Cell* 18:569-580
- (282)D Canaani, C Kahana, A Mukamel and Y Groner (1979); *PNAS* 76:3078-3082
- (283)A Cowie, C Tyndall and R Camen (1981); *NAR* 9:6305-6322
- (284)M Allan, WG Lanyon and J Paul (1983); *Cell* 35:187-197
- (285)M Grez, H Land, K Gieseke, G Schütz, A Jung and AE Sippel (1981); *Cell* 25:743-752
- (286)G Faye, DW Leung, K Tatchell, BD Hall and M Smith (1981); *PNAS* 78:2258-2262

- (287)M Rosenberg and D Court (1979); Ann.Rev.Genet.
13:319-353
- (288)JG Sutcliffe (1978); CSHSQB 43:77-90
- (289)D Stüber and H Bujard (1981); PNAS 78:167-171
- (290)DR Russell and GN Bennett (1982); Gene 20:231-243
- (291)AH Nishikawa and P Bailon (1975); Arch.Biochem.Biophys.
168:576-584
- (292)M Bröcker (1986); Gene Analysis Techniques, accepted
- (293)M Bröcker and E Amann (1986); Appl.Microbiol.Biotech-
nol. 23:294-296
- (294)E Amann and J Brosius (1985); Gene 40:183-190
- (295)CH Chung and AL Goldberg (1981); PNAS 78:4931-4935
- (296)A Sancar, AM Hack and WD Rupp (1979); J.Bacteriol.
137:692-693
- (297)AV Fowler (1972); J.Bacteriol. 112:856-860
- (298)A Ullmann (1984); Gene 29:27-31
- (299)U Winkler, W Rüger and W Wackernagel (1976); Bacterial,
Phage and Molecular Genetics. An Experimental Course,
Springer
- (300)TI Kemura and H Ozeki (1983); CSHSQB 47:1087-1097
- (301)E Remaut, H Tsao and W Fiers (1983); Gene 22:103-113
- (302)HA De Boer, LJ Comstock and M Vasser (1983); PNAS
80:21-25
- (303)E Amann, J Brosius and M Ptashne (1983); Gene
25:167-178
- (304)E Amann, M Bröcker and F Wurm (1984); Gene 32:203-215

LEBENS LAUF

Name: Haralabos Zorbas

Geboren: am 5.2.1956 in Thessaloniki/Griechenland als erster Sohn des Georgios und Eleni

Staatsangehörigkeit: Griechisch

Ausbildung:

1962 - 1968: Grundschule

1968 - 1974: Deutsche Schule Thessaloniki, Gymnasium der naturwissenschaftlich-mathematischen Richtung

Frühjahr 1974: Griechische Abschlußprüfung und Deutsche Feststellungsprüfung zur Erlangung der Hochschulreife (Abitur); Verleihung eines Stipendiums durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst für das Studium in der Bundesrepublik Deutschland

Wintersemester 1974: Beginn des Biologie-Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Herbst 1979: Mündliche Abschlußprüfung; Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Mikrobiologie und Biochemie

1980 - 1981: Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried bei München), Abteilung Prof. Zillig, mit dem Titel: "Klonierung und strukturelle Charakterisierung der Transkriptions-Terminationsstelle der Maus-rDNA"

24. Juli 1981: Diplom in Biologie

Herbst 1981: Beginn der Dissertation im Max-Planck-Institut

für Biochemie, Abteilung Prof. Kühn

1.4.1982 - 31.3.1985: Doktoranten-Stipendium durch die Max-Planck-Gesellschaft

Ab 1.4.1985: Wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung für Bindegewebforschung

Seit März 1984: Mitglied im Betriebsrat

Sommer 1984: Teilnahme an der Veranstaltung "International Summer School on Genome Organization and Function", auf Spetsai/Griechenland, unter Prof. H.G.Zachau

Sommer 1986: Teilnahme am Kurs "Microinjection and Electro-Transfection of Cells", am EMBL/Heidelberg, unter Dr. W.Ansorge

